

**MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**

(19)【発行国】 日本国特許庁 (J P)	(19)[ISSUINGCOUNTRY] Japanese Patent Office (JP)
(12)【公報種別】 公開特許公報 (A)	Laid-open (Kokai) patent application number (A)
(11)【公開番号】 特開平 9 - 1 2 4 5 0 9	(11)[UNEXAMINEDPATENTNUMBER] Unexamined-Japanese-Patent 9-124509
(43)【公開日】 平成 9 年 ( 1 9 9 7 ) 5 月 1 3 日	(43)[DATEOFFIRSTPUBLICATION] May 13th, Heisei 9 (1997)
(54)【発明の名称】 肝炎治療剤	(54)[TITLE] Hepatitis therapeutic agent
(51)【国際特許分類第 6 版】 A61K 39/395 ACS C07K 14/47 16/18 ZNA	(51)[IPC] A61K39/395 ACS C07K14/4716/18 ZNA
【F I】 A61K 39/395 ACS N C07K 14/47 16/18 ZNA	[FI] A61K39/395 ACSN C07K14/4716/18 ZNA
【審査請求】 未請求	[EXAMINATIONREQUEST] UNREQUESTED
【請求項の数】 1 0	[NUMBEROFCLAIMS] Ten
【出願形態】 F D	[Application form] FD
【全頁数】 1 8	[NUMBEROFPAGES] 18
(21)【出願番号】 特願平 7 - 3 0 3 4 9 1	(21)[APPLICATIONNUMBER] Japanese-Patent-Application-No. 7-303491
(22)【出願日】 平成 7 年 ( 1 9 9 5 ) 1 0 月 2	(22)[DATEOFFILING] October 27th, Heisei 7 (1995)

JP9-124509-A



7 日

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

0 0 0 0 0 2 1 3 0

[IDCODE]

000002130

【氏名又は名称】

住友電気工業株式会社

Sumitomo Electric Industries, Ltd.

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区北浜四丁目  
5 番 3 3 号

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 清野 研一郎

Kenichiro Seino

【住所又は居所】

東京都文京区本郷 2 - 1 - 1  
順天堂大学医学部免疫学講座内

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 榎垣 伸彦

Nobuhiko Kayagaki

【住所又は居所】

東京都文京区本郷 2 - 1 - 1  
順天堂大学医学部免疫学講座内

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 八木田 秀雄

Hideo Yagita

【住所又は居所】

東京都文京区本郷 2 - 1 - 1  
順天堂大学医学部免疫学講座内

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 奥村 康

Ko Okumura

【住所又は居所】

[ADDRESS]

東京都文京区本郷 2-1-1  
順天堂大学医学部免疫学講座内

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 中田 元巳

Motomi Nakata

【住所又は居所】

[ADDRESS]

神奈川県横浜市栄区田谷町 1 番  
地 住友電気工業株式会社横浜  
製作所内

(74) 【代理人】

(74)[PATENTAGENT]

【弁理士】

[PATENTATTORNEY]

【氏名又は名称】 西川 繁明

Shigeaki Nishikawa

(57) 【要約】

(57)[SUMMARY]

【課題】

肝炎の中でもアポトーシスによ  
る肝細胞の死に起因して発症す  
る肝炎の治療に特に効果的な肝  
炎治療剤を提供すること。

[SUBJECT]

Provide a hepatitis remedy especially effective  
for the treatment of the hepatitis which  
originates and develops the hepatocyte by  
apoptosis dies.

【解決手段】

ヒトの Fas リガンドに対する  
抗体またはその活性フラグメン  
トを有効成分として含有する肝  
炎治療剤。また、該抗体の超可  
変領域、可変領域を少なくとも  
含む肝炎治療剤。

[SOLUTION]

The hepatitis therapeutic agent which contains  
a human's antibody with respect to Fas ligand  
or its active fragment as an active ingredient.Moreover, the hepatitis therapeutic agent  
which contains at least the hypervariable region  
of this antibody, and a variable region.

【特許請求の範囲】

[CLAIMS]

**【請求項 1】**

ヒトの Fas リガンドに対する抗体またはその活性フラグメントを有効成分として含有する肝炎治療剤。

**[CLAIM 1]**

The hepatitis therapeutic agent which contains a human's antibody with respect to Fas ligand or its active fragment as an active ingredient.

**【請求項 2】**

ヒトの Fas リガンドに対する抗体またはその活性フラグメントが、該 Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントである請求項 1 記載の肝炎治療剤。

**[CLAIM 2]**

The hepatitis therapeutic agent of Claim 1 which is the monoclonal antibody to which a human's antibody with respect to Fas ligand or its active fragment reacts to this Fas ligand specifically, or its active fragment.

**【請求項 3】**

Fas を発現している肝臓の細胞に Fas リガンドが結合することにより引き起こされる肝臓のアポトーシスを抑制する請求項 1 または 2 記載の肝炎治療剤。

**[CLAIM 3]**

The hepatitis therapeutic agent of Claims 1 or 2 which suppress apoptosis of the liver caused when Fas ligand connects into the cell of the liver which is expressing Fas.

**【請求項 4】**

血中の GOT 及び GTP の値を改善することにより、肝臓の機能を改善する請求項 1 または 2 記載の肝炎治療剤。

**[CLAIM 4]**

The hepatitis therapeutic agent of Claims 1 or 2 which improve the function of a liver by improving the blood value of GOT and GTP.

**【請求項 5】**

ヒトの Fas リガンドに対する抗体の活性フラグメントが、F(a b')<sub>2</sub>、F a b'、F a b、F v、及び組換え F v 体からなる群より選ばれる少なくとも 1 種である請求項 1 または 2 記載の肝炎治療剤。

**[CLAIM 5]**

The hepatitis therapeutic agent of Claims 1 or 2 whose active fragments of the antibody with respect to a human's Fas ligand are at least one kind chosen out of the group consisting of F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab and Fv, and recombinant Fv body.

**【請求項 6】**

ヒトの Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体

**[CLAIM 6]**

The hepatitis remedy of Claim 2 which is the monoclonal antibody by which the monoclonal antibody which reacts to a human's Fas ligand

が、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5044、FERM BP-5045、FERM BP-5046、FERM BP-5047、及び FERM BP-5048 として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株のいずれか一つから産生されるモノクローナル抗体である請求項 2 記載の肝炎治療剤。

**【請求項 7】**

ヒトの Fas リガンドに対する抗体またはその活性フラグメントが、ヒトの Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体の H 鎖及び/または L 鎖の変領域を含むキメラ抗体分子である請求項 1 記載の肝炎治療剤。

**【請求項 8】**

キメラ抗体分子が、人体適用化キメラ抗体（ヒト型化抗体）である請求項 7 記載の肝炎治療剤。

**【請求項 9】**

キメラ抗体分子が、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5044、FERM BP-5045、FERM BP-5046、FERM BP-5047、及び FERM BP-5048 として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株のいずれか一つから産生されるモノクローナル抗体のそれぞれの超可変領域のアミノ酸配列を少なくとも含むものである請求項 7 記載の

specifically is produced from any one of each hybridoma cell strains deposited to the Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology as FERM(acceptance number) BP-5044, FERM BP-5045, FERM BP-5046, FERM BP-5047, and FERM BP-5048.

**[CLAIM 7]**

The hepatitis therapeutic agent of Claim 1 which is a chimera antibody molecule containing the variable region of the heavy chain of the monoclonal antibody to which a human's antibody with respect to Fas ligand or its active fragment reacts to a human's Fas ligand specifically, and/or L chain.

**[CLAIM 8]**

The hepatitis therapeutic agent of Claim 7 whose chimera antibody molecule is a human-body application-ized chimera antibody (human-type-ized antibody).

**[CLAIM 9]**

The hepatitis remedy of Claim 7 which is that which contains at least the amino acid sequence of each hypervariable region of the monoclonal antibody by which a chimera antibody molecule is produced from any one of each hybridoma cell strains deposited to the Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology as FERM(acceptance number) BP-5044, FERM BP-5045, FERM BP-5046, FERM BP-5047, and FERM BP-5048.

肝炎治療剤。

**【請求項 10】**

キメラ抗体分子が、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5044、FERM BP-5045、FERM BP-5046、FERM BP-5047、及び FERM BP-5048 として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株のいずれか一つから産生されるモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列を少なくとも含むものである請求項 7 記載の肝炎治療剤。

**[CLAIM 10]**

The hepatitis remedy of Claim 7 which is that which contains at least the amino acid sequence of the variable region of the monoclonal antibody by which a chimera antibody molecule is produced from any one of each hybridoma cell strains deposited to the Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology as FERM(acceptance number) BP-5044, FERM BP-5045, FERM BP-5046, FERM BP-5047, and FERM BP-5048.

**【発明の詳細な説明】**

**[DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION]**

**【0001】**

**[0001]**

**【発明の属する技術分野】**

本発明は、肝炎の治療剤に関し、さらに詳しくは、ヒトの Fas リガンド（以下、FasL と略記することがある）に対する抗体またはその活性フラグメントを有効成分として含有する肝炎治療剤に関する。本発明の肝炎治療剤は、肝炎の中でもアポトーシスによる肝細胞の死に起因して発症する肝炎の治療に特に効果的である。

**[TECHNICAL FIELD]**

This invention relates to the hepatitis remedy specifically which contains a human's antibody with respect to Fas ligand (it may abbreviate as FasL hereafter) or its active fragment as an active ingredient, about the remedy of a hepatitis.

The hepatitis therapeutic agent of this invention is effective for in particular the treatment of the hepatitis which is originated and developed by the hepatic cell by apoptosis of a hepatitis dies.

**【0002】**

**[0002]**

**【従来技術】**

多細胞生物は、その恒常性を保つため、細胞の増殖と死を巧妙にコントロールしている。個体

**[PRIOR ART]**

The multicellular organism has controlled propagation and the death of a cell skillfully, in order to maintain the homeostasis.

発生の過程では、多くの細胞が細胞死によって除去される。成体においても、臓器を構成する細胞は、常に増殖と死のバランスを保ちながら、その機能を維持している。このような細胞死は、予め予定された死であり、プログラム細胞死 (programmed cell death) とよばれている。これに対して、物理的または化学的要因によって引き起こされる死は、不慮の死 (accidental cell death) とよばれ、プログラム細胞死と区別されている。

**[0003]**

これら2つの死は、その過程が異なっている。プログラム細胞死では、細胞容積の縮小、核網状構造の消失と凝縮、細胞表面の微絨毛の消失及び水泡形成、そして、それらに続くアポトーシス小体 (apoptotic body) の形成などの形態学的な特徴によって定義されるアポトーシスの過程を経て細胞が死ぬと考えられている。アポトーシスでは、殆どの場合、染色体DNAの断片化反応を伴う。これに対して、不慮の死では、細胞や核が膨潤し、破壊するネクロシスの過程を経て死ぬと考えられている。

**[0004]**

ところが、抗癌剤や放射線による細胞死、ウイルス感染による細胞死、あるいは細胞障害性リンパ細胞による標的細胞の死などは、決してプログラム細胞死

In an organism generating process, a cell death removes many cell.

Also in an adult creature, the cell which comprises an organ is maintaining an its function, always maintaining propagation and the balance of death.

Such a cell death is death planned previously. It is called the program cell death (programmed cell death).

On the other hand, it is called physical or death (accidental cell death) unexpected in the death caused by the chemical factor, and it distinguishes with the program cell death.

**[0003]**

As for the death of these two, the process differs.

It is considered that a cell dies of a program cell death through the process of the apoptosis which the morphological characteristics, such as reduction of a cell volume, a loss of a nucleus network structure, condensation and a loss of the microvillus on the surface of a cell, the blister formation, and the formation of the apoptosis corpuscle (apoptotic body) which follows them, define.

In almost all cases, fragmentation reaction of chromosome DNA is accompanied in apoptosis. On the other hand, a cell and a nucleus swell in unexpected death.

It is considered that it dies through the process of necrosis to destroy.

**[0004]**

However, nevertheless, the cell death by the anticancer agent or the radiant flux, the cell death by virus infection, or the death of the target cell by the cytotoxic lymph cell, which is never considered to be a program cell death, understands that goes through the process of

であるとは考えられないにもかかわらず、アポトーシスの過程を経ることが分かってきた。このことから、現在では、アポトーシスとプログラム細胞死は、必ずしも同一ではないと考えられるに至り、両者は、区別されるようになっている。

**【0005】**

アポトーシスを誘導する要因または物質として、現在、多くのものが知られている。Fas (Fas抗原) は、アポトーシスを媒介する細胞表面タンパク質として知られている。Fasは、細胞に死のシグナルを伝える細胞表面タンパク質として単離されたもので、TNF/NGF受容体ファミリーに属する分子量45KdaのI型細胞膜貫通型タンパク質である。TNF/NGF受容体ファミリーのメンバーは、その殆どがそれぞれ特異的なリガンドに対する受容体であると考えられている。Fasも、アポトーシスのシグナルを媒介するリガンドに対する受容体と考えられている。Fasを発現している細胞は、FasがそのリガンドであるFasリガンドと結合することにより、アポトーシスのスイッチが入り、死にいたる。

**【0006】**

Fasリガンドは、Fasの生理的リガンドであり、分子量40Kdaの細胞表面タンパク質である。Fasリガンドは、その構造から、TNFファミリーであることが分かっている。F

apoptosis.

From these, currently then, it comes to consider that apoptosis and a program cell death are not necessarily the same, and both distinguish.

**[0005]**

It makes as the factor or the substance which induces apoptosis, and many thing is known currently.

Fas (Fas antigen) is known as cell surface protein which carries apoptosis.

Fas was isolated as cell surface protein which transmits the signal of death to a cell. It is I type cytoplasmic-membrane penetration type protein of molecular-weight 45Kda belonging to a TNF/NGF receptor family.

The member of a TNF/NGF receptor family is considered that the most is a receptor with respect to a respectively specific ligand.

Fas is also considered to be a receptor with respect to the ligand which carries the signal of apoptosis.

By connecting with Fas ligand whose Fas is the ligand, the switch of apoptosis is turned on and the cell which is expressing Fas dies and results.

**[0006]**

Fas ligand is a physiological ligand of Fas.

It is cell surface protein of molecular-weight 40Kda.

The structure shows that Fas ligand is TNF family.

Fas ligand has the activity which induces apoptosis to the cell which is expressing Fas.



a s リガンドは、F a s を発現している細胞にアポトーシスを誘導する活性を有している。F a s と F a s リガンドの系（すなわち、F a s システム）は、アポトーシスに関して、現在までに最も研究が進展している分野であり、多くの研究報告がなされている。例えば、F a s がアポトーシスのスイッチの役割を果たすことは、米原らの抗 F a s 抗体の作製に関する論文（J. Exp. Med., vol. 169, p. 1747-1756, 1989年）にまでさかのぼることができる。その後、F a s 遺伝子のクローニングにより、F a s の構造が明らかにされている（Cell vol. 66, p. 233-243, 1991年）。さらに、エイズ原因ウイルス HIV 感染 T 細胞に、F a s が発現していること（Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 87, p. 9620-9624, 1990年）、抗 F a s 抗体（J o - 2 抗体）をマウスに投与すれば、マウスは激症肝炎に似た現象を起こして死ぬこと（Nature vol. 364, P 806-809, 1993年）等が報告されている。この他にも種々の研究報告がなされ、これらについては実験医学 vol. 11, No. 17, 1993年の「アポトーシス—細胞死の構造—」羊土社版、及び実験医学 vol. 13, No. 16, 1995年の「アポトーシス研究の最前線—シグナル伝達構造から疾患まで」羊

The system (that is, Fas system) of Fas and Fas ligand is related with apoptosis.

It is the field in which research is progressing to until most currently.

Many research report is made.

For example, that Fas does the role of the switch of apoptosis can go back even to the paper (J. Exp. Med., vol. 169, p. 1747-1756, 1989) about preparation of the anti- Fas antibody by Yonehara.

After that, the cloning of Fas gene clarifies the structure of Fas (Cell vol. 66, p. 233-243, 1991).

Furthermore, the thing which Fas is expressing to the AIDS causative-virus HIV infection T cell (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 87, p. 9620-9624, 1990), If an anti- Fas antibody (Jo-2 antibody) is administered to a mouse, a mouse generating the phenomenon similar to the fulminant hepatitis, and dying (Nature vol. 364, P 806-809, 1993) etc. is reported.

In addition various research reports are made and these are summarized into below in detail. Experimental-medicine vol. 11, No. 17, the "structure of an apoptosis -cell death J-" Yodosha version in 1993, And experimental-medicine vol. 13, No. 16, the Yodosha version "from the forefront of apoptosis research - signal-transduction structure to the disease" in 1995.

土社版に詳しくまとめられている。

**【0007】**

肝臓に関しては、前述の抗Fas抗体(Jo-2抗体)投与によるマウスの劇症肝炎発症以外にも、種々の報告がなされている。これらの報告内容は、実験医学vol.13, No.16, p.200-204, 1995年に、「肝炎とアポトーシス」と題する論文としてまとめられている。この文献によれば、肝炎に関し、以下のようなことが判明している。

(1) 慢性肝炎において、活動性の指標となるpiecemeal necrosis(削りとり壊死)は、門脈域周囲で認められるが、この領域で起こる細胞死の全体がネクロシスではなくてアポトーシスである。

(2) ウイルス性肝炎における細胞障害機序については、細胞性免疫が重要な役割をもっている。ウイルス抗原が感染肝細胞内でプロセスされた後、HLAクラスIによって肝細胞表面に提示され、これをCTLが認識し傷害する。

(3) 肝炎ウイルスによる肝細胞障害に、Fasシステムを介したアポトーシスが関与している可能性が考えられる。すなわち、肝浸潤リンパ球がFasリガンドを発現し、Fas抗原を発現している肝細胞にアポトーシスを誘導するという可能性がある。

**【0008】**

**[0007]**

About the liver, various reports are made besides fulminant-hepatitis onset of the mouse by above-mentioned anti-Fas antibody (Jo-2 antibody) administration.

These content of a report is collected as a paper to be entitled "a hepatitis and apoptosis" in experimental-medicine vol.13, No.16, p.200-204, and 1995.

According to this literature, it is related with a hepatitis and followings have become clear.

**(1)**

Chronic hepatitis.

WHEREIN, piecemeal used as the active index necrosis (it shaves off and necroses) observes in the surroundings of a portal-vein region.

However, the whole cell death which occurs in this region is not necrosis but apoptosis.

**(2)**

About the cell-damage mechanism in the viral hepatitis, the cellular immunity has the important role.

It is presented to a hepatic-cell surface by HLA class I after carrying out the process of the virus antigen by infection liver intracellular.

CTL recognizes and carries out the injury of this.

**(3)**

Possibility that the apoptosis which is through liver Fas system by the hepatitis virus is involving can be considered.

That is, it is possibility that a liver infiltration lymphocyte expresses Fas ligand, apoptosis being induced to the hepatic cell which is expressing Fas antigen.

**[0008]**

(4) 抗Fas抗体(マウスモノクローナル抗体、IgM分画)を用いた免疫組織学的な手法により、B型及びC型肝炎組織におけるFas抗原の発現についての検討が行われた結果、B型及びC型肝炎組織におけるFas抗原の発現と肝炎の活動性が相関することが分かった。

(5) C型慢性肝炎において、肝内に浸潤している単核球は、Fas抗原を発現している肝細胞にアポトーシスを誘導可能なFasリガンドを表出していることを意味し、肝細胞障害機序にFasシステムを介したアポトーシスが関与することを示唆するものである。

このように、ウイルス性肝炎では、B型及びC型を問わずFas抗原が高発現していることが分かる。しかしながら、Fasリガンド誘導の機序については、細胞内のシグナルなど不明な点も多く、今後の研究課題として残されているのが現状である。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、肝炎の中でもアポトーシスによる肝細胞の死に起因して発症する肝炎の治療に特に効果的な肝炎治療剤を提供することにある。前述したように、肝臓における劇症肝炎やウイルス性肝炎では、その発症において、FasとFasリガンドの系(Fasシステム)が

(4)

By the immune-tissue study-procedure using the anti- Fas antibody (a mouse monoclonal antibody, IgM fraction), study about an expression of Fas antigen in a B type and a hepatitis-C tissue was performed.

It was found that an expression of Fas antigen in a B type and a hepatitis-C tissue and the activity of a hepatitis correlate as a result.

(5)

Chronic hepatitis C.

WHEREIN, it implies that the mononuclear leukocyte currently infiltrated in a liver has expressed Fas ligand which can induce apoptosis to the hepatocyte which is expressing Fas antigen. It suggests that for liver cell-damage the apoptosis which is through Fas system involves.

Thus, in the viral hepatitis, it turns out that Fas antigen is carrying out a high expression regardless of a B type and a C type.

However, there are also many unknown points, such as the signal of intracellular, about the mechanism of Fas ligand inducing, and remaining as a future research subject is the present condition.

[0009]

**[PROBLEM ADDRESSED]**

Objective of the invention is to provide a hepatitis remedy especially effective for the treatment of the hepatitis which is originated and developed the hepatocyte by apoptosis of a hepatitis dies.

At the fulminant hepatitis in a liver as mentioned above and the viral hepatitis, in the onset

WHEREIN, the system (Fas system) of Fas and Fas ligand considered whether not to involve in a certain form, and these inventors examined earnestly using the antibody with respect to Fas

何らかの形で関与しているのではないかと考え、本発明者たちは、Fasリガンドに対する抗体を用いて鋭意検討を行った結果、in vitroの実験系において、Fasリガンドが肝細胞に障害を与えること、さらには、この障害は、抗Fasリガンド抗体により阻止できることを見出した。また、Fasリガンドに対する抗体が肝炎の発症を抑制することができるという新規な知見を得た。そして、この抗体を有効成分とする製剤が、ウイルス性肝炎などの肝疾患に対する治療薬（抗肝炎剤）として有用であることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】  
 本発明によれば、ヒトのFasリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントを有効成分として含有する肝炎治療剤が提供される。また、本発明によれば、以下のような好ましい実施態様が提供される。

1. ヒトのFasリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントが、該Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントである前記の肝炎治療剤。
2. Fasを発現している肝臓の細胞にFasリガンドが結合することにより引き起こされ

ligand.

As a result, in Experiment system of vitro WHEREIN, it discovered further that Fas ligand does damage to a hepatic cell, and that this damage could be blocked by the anti- Fas ligand antibody.

Moreover, the novel findings that the antibody with respect to Fas ligand could suppress the onset of a hepatitis were obtained.

And, the formulation which make this antibody an active ingredient discovered that it was useful as therapeutic agent (anti- hepatitis agent) with respect to hepatic disorders, such as the viral hepatitis.

This invention came to complete based on these findings.

[0010]

#### [SOLUTION OF THE INVENTION]

According to this invention, the hepatitis remedy which contains a human's antibody with respect to Fas ligand or its active fragment as an active ingredient is provided.

Moreover, according to this invention, the following preferable embodiments are provided.

1. The above-mentioned hepatitis therapeutic agent which is monoclonal antibody to which human's antibody with respect to Fas ligand or its active fragment reacts to this Fas ligand specifically, or its active fragment.
2. The above-mentioned hepatitis therapeutic agent which suppresses apoptosis of liver caused when Fas ligand connects into cell of liver which is expressing Fas.
3. The above-mentioned hepatitis therapeutic agent which improves function of liver by improving blood value of GOT and GTP.

る肝臓のアポトーシスを抑制する前記の肝炎治療剤。

3. 血中のGOT及びGTPの値を改善することにより、肝臓の機能を改善する前記の肝炎治療剤。

**[0011]**

4. ヒトのFasリガンドに対する抗体の活性フラグメントが、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、及び組換えFv体からなる群より選ばれる少なくとも1種である前記の肝炎治療剤。

5. ヒトのFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体が、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERMBP-5044、FERMBP-5045、FERMBP-5046、FERMBP-5047、及びFERMBP-5048として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株のいずれか一つから産生されるモノクローナル抗体である前記の肝炎治療剤。

6. 前記モノクローナル抗体の超可変領域を少なくとも含むキメラ抗体分子である肝炎治療剤。

7. 前記モノクローナル抗体の可変領域を少なくとも含むキメラ抗体分子である肝炎治療剤。

**[0012]**

**[発明の実施の形態]**

本発明の肝炎治療剤の有効成分

**[0011]**

4. The above-mentioned hepatitis therapeutic agent whose active fragment of antibody with respect to human's Fas ligand is at least one kind chosen out of group consisting of F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab and Fv, and recombinant Fv body.

5. The above-mentioned hepatitis remedy which is monoclonal antibody by which monoclonal antibody which reacts to human's Fas ligand specifically is produced from any one of each hybridoma cell strains deposited to Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology as FERM(acceptance number) BP-5044, FERMBP-5045, FERM BP-5046, FERM BP-5047, and FERM BP-5048.

6. Hepatitis therapeutic agent which is chimera antibody molecule which contains at least hypervariable region of above-mentioned monoclonal antibody.

7. Hepatitis therapeutic agent which is chimera antibody molecule which contains at least variable region of above-mentioned monoclonal antibody.

**[0012]**

**[Embodiment]**

The antibody (that is, anti-FasL antibody) with respect to Fas ligand used as an active

として使用されるFasリガンドに対する抗体（すなわち、抗FasL抗体）は、細胞表面分子であるFasリガンド、及びマトリックスメタロプロテアーゼにより分解されて細胞培養上清液や生体の体液中に存在する可溶性Fasリガンド（sFasL）を認識する抗体である。Fasリガンドに対する抗体としては、Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体が好ましい。さらには、FasリガンドとFasとの結合を阻害することができる抗体がより好ましい。このようなモノクローナル抗体は、例えば、次のような方法により得ることができる。

#### [0013]

(1) 動物（例、マウスなどの齧歯類動物）を、Fasリガンドを発現させたCOS細胞で免疫感作する。ただし、動物としては、Fasの機能を欠損したものを選ぶ。

(2) この免疫感作した動物から抗体産生細胞を調製して、その懸濁液を形成する。主として、脾臓細胞やリンパ節細胞を用いるが、末梢リンパ球を用いてもよい。脾臓細胞を使用する場合には、この免疫感作した齧歯類動物から脾臓を摘出して、脾細胞の懸濁液を形成する。

(3) 該抗体産生細胞の懸濁液をミエローマ細胞と混合して両細胞を融合する。例えば、該脾細胞の懸濁液をマウスのミエローマ細胞と融合促進剤（例、ポリエチレングリコール）の存在

ingredient of the hepatitis therapeutic agent of this invention is an antibody which recognizes Fas ligand which is a cell surface molecule, and soluble Fas ligand (sFasL) which is decomposed by the matrix metalloprotease and exists in a cell-culture supernatant liquid or the body fluid of a living body.

The monoclonal antibody which reacts to Fas ligand specifically as an antibody with respect to Fas ligand is preferable.

Furthermore, the antibody which can obstruct a connection with Fas ligand and Fas is more preferable.

Such a monoclonal antibody can be obtained by the following methods, for example.

#### [0013]

(1)

The immunity sensitization of the animal (rodent animals, such as an example and a mouse) is carried out in COS cell which made Fas ligand express.

However, as an animal, that which was a loss lacking in the function of Fas is chosen.

(2)

An antibody producing cell is prepared from this animal that carried out the immunity sensitization.

The suspension is formed.

Spleen cell and a lymph-node cell are mainly used.

However, a peripheral lymphocyte may be used.

In using spleen cell, it extracts spleen from this rodent animal that carried out the immunity sensitization.

The suspension of a spleen cell is formed.

(3)

The suspension of this antibody producing cell is mixed with a myeloma cell, and a both cell is united.

下で混合して両細胞を融合する。電気的処理により細胞融合させることもできる。ここで用いるミエローマ細胞としては、次の選択培養において、抗体産生細胞と識別可能なもの（例、8-アザグアニン耐性株）を用いる。

**【0014】**

(4) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する。すなわち、抗体産生細胞は生存できるが、ミエローマ細胞は死滅する選択培地中で培養して、抗体産生細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを選別する。選択培地としては、例えば、8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞を用いた場合には、一般に、HAT培地（すなわち、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン培地）を用いる。

(5) ハイブリドーマを含有する培養上清液分泌されている抗体が、Fasリガンドを発現させたCOS細胞の上清中に存在するFasリガンドによるFas発現細胞への攻撃を阻害することを指標にして、所望の抗原に対するものか否かを決定する。

**【0015】**

(6) 所望の抗体を分泌してい

For example, the suspension of this spleen cell is mixed in the presence of the myeloma cell and the fusion promoter (the example, polyethyleneglycol) of a mouse, and a both cell is united.

A cell fusion can be carried out by electric process.

As a myeloma cell used here, in the following selective culture

WHEREIN, a thing discriminable from an antibody producing cell is used (an example, 8-azaguanine resistant stock).

**[0014]**

(4)

It dilutes and cultivates in the medium which does not support the myeloma cell whose united cell is not united.

The hybridoma which the antibody producing cell and the myeloma cell united is selected.

That is, an antibody producing cell can survive.

However, a myeloma cell is cultivated in the selection times underground which becomes extinct.

The hybridoma which the antibody producing cell and the myeloma cell united is selected.

When as a selective medium, for example, a 8-azaguanine resistant myeloma cell is used, HAT culture medium (that is, hypoxanthine-aminopterin- thymidine culture medium) is used generally.

(5)

The antibody containing a hybridoma by which culture supernatant-liquid secretion make it the index to obstruct the attack to Fas expression cell by Fas ligand which exists in the supernatant liquid of COS cell which made Fas ligand express.

It determines whether to be a thing with respect to a desired antigen.

**[0015]**

(6)

The cell group in the culture well in which the

る細胞が存在する培養ウェル中の細胞群をクローニングする。クローニングは、通常、限界希釈法により行う。

(7) 所望の抗体を分泌しているクローンを選択する。

(8) 再度クローニングを行って、所望の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマクローンを樹立する。

(9) このハイブリドーマの培養上清液、あるいは該ハイブリドーマをマウス（例、ヌードマウス）腹腔内に投与して得られた腹水中からモノクローナル抗体を調製する。

#### [0016]

本発明の肝炎治療剤の有効成分として使用するモノクローナル抗体としては、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5044 (ハイブリドーマ NOK 1)、FERM BP-5045 (ハイブリドーマ NOK 2)、FERM BP-5046 (ハイブリドーマ NOK 3)、FERMBP-5047 (ハイブリドーマ NOK 4)、及び FERM BP-5048 (ハイブリドーマ NOK 5) として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株から産生される各モノクローナル抗体 (NOK 1~5) を挙げるができる。

#### [0017]

ヒトの Fas リガンドに対する抗体は、免疫グロブリンである。ヒトの Fas リガンドに特

cell which is secreting a desired antibody exists is cloned.

A cloning is usually performed with a threshold dilution method.

(7)

The clone which is secreting a desired antibody is selected.

(8)

It clones again and the hybridoma clone which is secreting the monoclonal antibody with respect to a desired antigen is established.

(9)

A monoclonal antibody is prepared out of the abdominal dropsy which administers the culture supernatant liquid of this hybridoma, or this hybridoma to mouse (example, nude mouse) intraperitoneal, and was obtained.

#### [0016]

As a monoclonal antibody used as an active ingredient of the hepatitis therapeutic agent of this invention For example, it is acceptance-number FERM to the Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology BP-5044 (hybridoma NOK 1), FERM BP-5045 (hybridoma NOK 2), FERM BP-5046 (hybridoma NOK 3), FERMBP-5047 (hybridoma NOK 4), And FERM BP-5048 (hybridoma NOK 5). Each monoclonal antibody (NOK 1-5) produced from each hybridoma cell strain these-deposited can be mentioned.

#### [0017]

The antibody with respect to a human's Fas ligand is an immunoglobulin.

The monoclonal antibody which reacts to a human's Fas ligand specifically is a uniform



異的に反応するモノクローナル抗体は、均一な免疫グロブリンであり、例えば、(1) IgMのクラスに属し、L鎖が $\kappa$ 鎖であるもの、(2) IgG<sub>2a</sub>のサブクラスに属し、L鎖が $\kappa$ 鎖であるもの、(3) IgG<sub>1</sub>のサブクラスに属し、L鎖が $\kappa$ 鎖であるもの、(4) IgG<sub>3</sub>のサブクラスに属し、L鎖が $\kappa$ 鎖であるものなどが存在する。

#### 【0018】

Fasリガンドに対する抗体の活性フラグメントは、抗Fasリガンド抗体の有する抗原抗体反応活性を有する免疫グロブリンのフラグメントを意味する。このような活性フラグメントとしては、具体的には、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、及び組換えFv体などがある。これらの活性フラグメントは、免疫グロブリン（抗FasL抗体）から常法により調製することができる。例えば、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、免疫グロブリンIgGをペプシンを用いて消化することにより得ることができる。Fab'フラグメントは、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを2-メルカプトエタノールなどの試薬で還元して、モノヨード酢酸でアルキル化することにより得ることができる。Fabのフラグメントは、IgGをパパイン消化することにより得ることができる。Fvフラグメントは、H鎖可変部(V<sub>H</sub>)とL鎖可変部(V<sub>L</sub>)を非共役結合で結合して得られる。組換えFv体は、例えば、

immunoglobulin.

For example, it belongs to the class of (1) IgM, it belongs to the subclass of that whose L chain is a chain (kappa), and (2) IgG<sub>2a</sub>, and it belongs to that whose L chain is (kappa), and the subclass of (3) IgG<sub>1</sub>.

L chain belongs to that which is a chain (kappa), and the subclass of (4) IgG<sub>3</sub>, and that whose L chain is a chain (kappa) exists.

#### 【0018】

The active fragment of the antibody with respect to Fas ligand means the fragment of the immunoglobulin which has the antigen-antibody-reaction activity which an anti-Fas ligand antibody has.

As such an active fragment, there are F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab and Fv, recombinant Fv body, etc. specifically.

These active fragments can be prepared by the conventional method from an immunoglobulin (anti-FasL antibody).

For example, F(ab')<sub>2</sub> fragment can be obtained by digesting an immunoglobulin IgG using pepsin.

Fab' fragment can reduce F(ab')<sub>2</sub> fragment with reagents, such as 2-mercaptoethanol, and can obtain it by alkylating by mono iodoacetic acid.

The fragment of Fab can be obtained by carrying out papain digestion of the IgG.

Fv fragment connects a heavy-chain variable region (V<sub>H</sub>) and a L-chain variable region (V<sub>L</sub>) by nonconjugated connection, and is obtained. As for recombinant Fv body, the sequence of DNA is carried out about the gene which hits the variable region of the heavy chain of an antibody, and L chain from the hybridoma which produces a monoclonal antibody, for example, and

The base sequence which codes a heavy-chain variable region (V<sub>H</sub>) and a L-chain variable region (V<sub>L</sub>) is determined, and then, these DNA fragments can be integrated in a

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから抗体のH鎖及びL鎖の可変部にあたる遺伝子についてDNAをシーケンスして、H鎖可変部 ( $V_H$ ) とL鎖可変部 ( $V_L$ ) をコードする塩基配列を決定し、次いで、これらのDNA断片をベクターに組み込んで、 $V_H$ -Linker- $V_L$  構造を有する一価の抗体活性フラグメントを大腸菌や動物細胞等の細胞に産生させることにより得ることができる。

**【0019】**

本発明の実施例で使用したSCIDマウスは、ヒトの細胞を移植することができる動物として有名である。このSCIDマウスは、1983年にBosmaらにより、成熟したリンパ球(T細胞及びB細胞)を全くもたない免疫不全ミュータントマウスとして発見されたマウスである(Nature, vol. 301, p. 527-530, 1983)。このマウスは、ヒトの重症複合免疫不全症(SCID)と同様の病態を呈する。このSCIDマウスにヒトの自己免疫疾患である原発性胆汁性肝硬変症SLE、自己免疫性甲状腺炎等の患者のリンパ球やリンパ組織を移入し、病象の再現を試みる動きがある。これらは、J. Exp. Med., vol. 170, p. 1919-1930, 1989、J. Exp. Med., vol. 172, p. 985-988, 1990、Clin. Exp. Immunol, vol. 84, p. 34

vector and it can obtain by making cells, such as an Escherichia coli and an animal cell, produce the monovalent antibody active fragment which has  $V_H$ -Linker- $V_L$  structure.

**[0019]**

SCID mouse used in the Example of this invention is famous as an animal which can transplant a human's cell.

This SCID mouse is a mouse discovered by Bosma et al. by making as the immunodeficiency mutant mouse which does not have at all the lymphocyte (the T cell and B cell) which ripened in 1983 (Nature, vol. 301, p.527- 530, 1983).

This mouse presents the illness condition similar to a human's severe-combined-immunodeficiency disease (SCID).

A patient's lymphocyte and lymphatic tissues which are a human's autoimmune-disease diseases, such as primary bile property cirrhosis SLE and the autoimmune thyroiditis, are introduced into this SCID mouse, and there is a motion which tries reproduction of the sickness.

These describes in J.Exp.Med., vol.170, p.1919- 1930, 1989, J.Exp.Med., vol.172, and p.985- in 988, 1990, Clin.Exp.Immunol, vol.84, and p.34-37 1991 years etc.

Moreover, the same trial is reported in Sciece, vol.241, p.1632-1639, and 1988.

— 37, 1991年などに記載されている。また、同じような試みが *Science*, vol. 241, p. 1632—1639, 1988年に報告されている。

**【0020】**

本発明者は、SCIDマウスの腹腔内にヒトの末梢血単核細胞 (PBMC) を投与し、投与後、6時間ないし12時間後に、D-ガラクトサミン20mg/マウスとSEB (*Staphylococcal enterotoxin B*) 10 $\mu$ g/マウスを同じく腹腔内に投与することで、肝炎を引き起こすことに成功した。この系は、Fasを発現しているSCIDマウスにヒトのPBMCを入れ、このマウスにDガラクトサミンとSEB刺激することで、導入したヒトPBMC中のT細胞が活性化し、細胞の表面にFasリガンドを発現するとともに、マウスの腹腔内及び体液中に可溶性のFasリガンドが分泌されることで、Fasを発現しているマウス肝細胞がFasリガンドを介して、アポトーシスで死滅し、その結果として、肝炎が発症するという系である。

**【0021】**

本発明の肝炎治療剤は、Fasを発現している肝臓の細胞にFasリガンドが結合することにより引き起こされる肝臓のアポトーシスを抑制することにより、肝炎を治療するものと推定される。より詳細には、Fas

**[0020]**

This inventor administers a human's peripheral-blood mononuclear cell (PBMC) to intraperitoneal of SCID mouse.

After administration, 6 hour thru hours [ 12 hours ] after, they are D-galactosamine 20 mg / mouse, and SEB (by administering *Staphylococcal enterotoxin B*) 10 micro-g / mouse to intraperitoneal similarly, it succeeded in causing a hepatitis.

This system puts a human's PBMC into SCID mouse which is expressing Fas, and D galactosamine and the T cell in human PBMC introduced by being stimulating SEB activate it to this mouse. Fas ligand is expressed on the surface of a cell. The mouse hepatocyte which is expressing Fas by the inside of an abdomen of a mouse and Fas ligand soluble in a body fluid being secreted becomes extinct by apoptosis through Fas ligand.

As a result, it is the system that a hepatitis develops.

**[0021]**

The hepatitis therapeutic agent of this invention is estimated to be that which treats a hepatitis by suppressing apoptosis of the liver caused when Fas ligand connects into the cell of the liver which is expressing Fas.

More specifically, the switch of apoptosis is turned on when Fas connects the hepatic cell which is expressing Fas, with Fas ligand.

を発現している肝細胞は、FasがFasリガンドと結合することにより、アポトーシスのスイッチが入るが、本発明の肝炎治療剤は、このような反応を抑制することにより肝炎を治療するものと推定される。また、本発明の肝炎治療剤は、肝機能を改善し、血中のGOT（グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ）及びGPT（グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ）の値を改善することができる。具体的には、本発明の肝炎治療剤は、血中のGOT及びGPTの濃度を正常値に回復させることができる。

#### 【0022】

本発明で使用するFasリガンドに対するモノクローナル抗体（抗FasL抗体）またはその活性フラグメントの肝炎治療剤としてヒトに作用させる場合、HAMA等の外来蛋白質に対する抗体の生成を抑えて効果的に作用させるためには、該抗FasL抗体またはその活性フラグメントをヒト型化あるいはキメラ型化することが効果的である。これらに関する技術は、すでに公知の文献あるいは特許公報に記載されており、抗体産生ハイブリドーマさえあれば、容易に実施することができる。特許公報では、EP-A-0120694、EP-0125023、EP-0171496、EP-A-0173494、WO86101533等があり、一般文献としては、Nature, Vol. 322, p. 32

However, the hepatitis therapeutic agent of this invention is estimated to be that which treats a hepatitis by suppressing such reaction. Moreover, the hepatitis therapeutic agent of this invention improves a liver function.

The blood value of GOT (glutamic-oxalacetic-acid transaminase) and GPT (glutamic-acid-pyruvic-acid transaminase) is improvable.

The hepatitis therapeutic agent of this invention can make normal values recover blood concentration of GOT and GPT specifically.

#### [0022]

It is effective human-type-ization or to form this anti- FasL antibody or its active fragment into a chimera type, in order to control a formation of the antibody with respect to a HAMA etc. visitor protein and to make act effectively, when making act on a human as the monoclonal antibody (anti- FasL antibody) with respect to Fas ligand used by this invention, or a hepatitis therapeutic agent of the active fragment.

The technique about these is already described in well-known literature or the patent gazette.

If there is even an antibody-production hybridoma, it can be performed easily.

In the patent gazette, there are EP-A-0120694, EP-0125023, EP-0171496, EP-A-0173494, WO86101533, etc.

As common literature, Nature, Vol.322, p.323-327 (1988), Nature, vol.321, p.522-525 (1986), Nature, vol.328, p.731-734 (1987), etc. are mentioned.

The public knowledge technique currently shown by these being based, an anti- FasL antibody or its active fragment, human-type-izing or a chimera type can be formed.

3-327 (1988), Nature, vol. 321, p. 522-525 (1986), Nature, vol. 328, p. 731-734 (1987) 等が挙げられる。これらに開示されている公知技術に基づいて、抗FasL抗体またはその活性フラグメントをヒト型化あるいはキメラ型化することができる。

**【0023】**

ヒト型化あるいはキメラ型化するに際し、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044 (ハイブリドーマNOK1)、FERM BP-5045 (ハイブリドーマNOK2)、FERM BP-5046 (ハイブリドーマNOK3)、FERM BP-5047 (ハイブリドーマNOK4)、及びFERM BP-5048 (ハイブリドーマNOK5) として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株から産生される各モノクローナル抗体 (NOK1~5) の可変領域のアミノ酸配列を少なくとも含ませることが好ましい。

**【0024】**

このようなモノクローナル抗体 NOK1~5 のH鎖及びL鎖の可変領域のアミノ酸配列及びその塩基配列は、本発明者らが見いだしたものであり、配列表に記載する。

(1) ハイブリドーマNOK1 が産生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表

**[0023]**

It faces human-type-ization or forming a chimera type, and it is acceptance-number FERM to the Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology. BP-5044 (hybridoma NOK 1), FERMBP-5045 (hybridoma NOK 2), FERM BP-5046 (hybridoma NOK 3), FERM BP-5047 (hybridoma NOK 4), And FERM BP-5048 (hybridoma NOK 5). it is preferable to contain at least the amino acid sequence of the variable region of each monoclonal antibody (NOK 1-5) produced from each hybridoma cell strain deposited as these,

**[0024]**

The present inventors found out the amino acid sequence of the variable region of the heavy chain of such monoclonal-antibody NOK 1-5, and L chain, and its base sequence.

It describes in a sequence table.

(1)

The hypervariable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 1 produces is (1) Ser of 30th to 34th Asn, (2) Arg of 49th to 65th Gly, and (3) Tyr of 93rd to

の配列番号1で表されるアミノ酸配列の(1)30番目のSerから34番目のAsn、(2)49番目のArgから65番目のGly、及び(3)93番目のTyrから109番目のTyrであり、L鎖の超可変領域は、配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列の(1)24番目のArgから34番目のAsn、(2)50番目のTyrから56番目のSer、及び(3)89番目のGlnから97番目のThrである。

**[0025]**

(2) ハイブリドーマNOK2が産生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列の(1)30番目のAsnから34番目のGly、(2)49番目のTyrから65番目のGly、及び(3)93番目のTyrから107番目のTyrであり、L鎖の超可変領域は、配列表の配列番号7で表されるアミノ酸配列の(1)24番目のLysから39番目のGly、(2)55番目のLeuから61番目のSer、及び(3)95番目のGlnから102番目のThrである。

**[0026]**

(3) ハイブリドーマNOK3が産生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表の配列番号9で表されるアミノ酸配列の(1)30番目のSerから34番目のAsn、(2)49番目のArgから65番目の

109th Tyr of the amino acid sequence expressed with sequence number 1 of a sequence table.

The hypervariable region of L chain is (1) 34th Asn from Arg of 24th, (2) Tyr of 50th to 56th Ser, and (3) Gln of 89th to 97th Thr of the amino acid sequence expressed with sequence number 3 of a sequence table.

**[0025]**

(2)

The hypervariable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 2 produces is (1) 34th Gly from Asn of 30th, (2) Tyr of 49th to 65th Gly, (3) Tyr of 93rd to 107th Tyr of the amino acid sequence expressed with sequence number 5 of a sequence table.

The hypervariable region of L chain is (1) 39th Gly from Lys of 24th, (2) Leu of 55th to 61st Ser, (3) 102nd Thr from Gln of 95th of the amino acid sequence expressed with sequence number 7 of a sequence table.

**[0026]**

(3)

The hypervariable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 3 produces is (1) 34th Asn from Ser of 30th, (2) Arg of 49th to 65th Gly, (3) Tyr of 93rd to 105th Val of the amino acid sequence expressed with sequence number 9 of a sequence table.

G l y、及び(3)93番目のT y rから105番目のV a lである。

**[0027]**

(4) ハイブリドーマNOK4が産生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表の配列番号11で表されるアミノ酸配列の(1)32番目のT y rから35番目のA s n、(2)50番目のT y rから65番目のA s n、及び(3)93番目のT y rから107番目のT y rであり、L鎖の超可変領域は、配列表の配列番号13で表されるアミノ酸配列の(1)24番目のA r gから38番目のH i s、(2)54番目のA r gから60番目のS e r、及び(3)93番目のG l nから101番目のT h rである。

**[0028]**

(5) ハイブリドーマNOK5が産生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表の配列番号15で表されるアミノ酸配列の(1)30番目のT h rから34番目のH i s、(2)49番目のT y rから65番目のA s p、及び(3)93番目のT y rから106番目のT y rであり、L鎖の超可変領域は、配列表の配列番号17で表されるアミノ酸配列の(1)24番目のL y sから34番目のA l a、(2)50番目のT y rから56番目のT h r、及び(3)89番目のG l nから97番目のT h rである。

**[0027]**

(4)

The hypervariable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 4 produces is (1) 35th Asn from Tyr of 32nd, (2) Tyr of 50th to 65th Asn, and (3) Tyr of 93rd to 107th Tyr of the amino acid sequence expressed with sequence number 11 of a sequence table.

The hypervariable region of L chain is (1) 38th His from Arg of 24th, (2) Arg of 54th to 60th Ser, And (3) Gln of 93rd to 101st Thro of the amino acid sequence expressed with sequence number 13 of a sequence table.

**[0028]**

(5)

The hypervariable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 5 produces is (1) 34th His from Thr of 30th, (2) Tyr of 49th to 65th Asp, And (3) Tyr of 93rd to 106th Tyro of the amino acid sequence expressed with sequence number 15 of a sequence table.

The hypervariable region of L chain is (1) 34th Ala from Lys of 24th and (2) Tyr of 50th to 56th Thr, And (3) 97th Thr from Gln of 89th of the amino acid sequence expressed with sequence number 17 of a sequence table.

**【0029】**

(6) ハイブリドーマNOK 1 が産生するモノクローナル抗体のH鎖の可変領域は、配列番号1で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号2の塩基配列である。また、L鎖の可変領域は、配列番号3で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号4の塩基配列である。

**【0030】**

(7) ハイブリドーマNOK 2 が産生するモノクローナル抗体のH鎖の可変領域は、配列番号5で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号6の塩基配列である。また、L鎖の可変領域は、配列番号7で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号8の塩基配列である。

**【0031】**

(8) ハイブリドーマNOK 3 が産生するモノクローナル抗体のH鎖の可変領域は、配列番号9で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号10の塩基配列である。

**【0032】**

(9) ハイブリドーマNOK 4 が産生するモノクローナル抗体のH鎖の可変領域は、配列番号11で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号12の塩基配列である。また、L鎖の可変領域は、配列番号13で表されるアミノ酸配列

**[0029]**

(6)

The variable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 1 produces is an amino acid sequence shown with sequence number 1.

The base sequence is a base sequence of sequence number 2.

Moreover, the variable region of L chain is an amino acid sequence shown with sequence number 3.

The base sequence is a base sequence of sequence number 4.

**[0030]**

(7)

The variable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 2 produces is an amino acid sequence shown with sequence number 5.

The base sequence is a base sequence of sequence number 6.

Moreover, the variable region of L chain is an amino acid sequence shown with sequence number 7.

The base sequence is a base sequence of sequence number 8.

**[0031]**

(8)

The variable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 3 produces is an amino acid sequence shown with sequence number 9.

The base sequence is a base sequence of sequence number 10.

**[0032]**

(9)

The variable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 4 produces is an amino acid sequence shown with sequence number 11.

The base sequence is a base sequence of sequence number 12.

Moreover, the variable region of L chain is an amino acid sequence shown with sequence



であり、その塩基配列は、配列番号 14 の塩基配列である。

number 13.

The base sequence is a base sequence of sequence number 14.

**【0033】**

(10) ハイブリドーマ NOK 5 が産生するモノクローナル抗体の H 鎖の可変領域は、配列番号 15 で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号 16 の塩基配列である。また、L 鎖の可変領域は、配列番号 17 で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号 18 の塩基配列である。

**[0033]**

(10)

The variable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 5 produces is an amino acid sequence shown with sequence number 15.

The base sequence is a base sequence of sequence number 16.

Moreover, the variable region of L chain is an amino acid sequence shown with sequence number 17.

The base sequence is a base sequence of sequence number 18.

**【0034】**

本発明の肝炎治療剤の剤形としては、活性な有効成分を含む通常の医薬または医薬組成物と同様に、例えば、注射剤、錠剤、カプセル剤、坐薬、噴霧剤、クリーム剤、パップ剤、点眼剤等を挙げることができる。例えば、注射剤であれば、当該抗体を含む溶液を無菌状態で調製し、必要があれば、マンニトール等の安定化剤、賦形剤等を補助成分として添加してもよい。これをアンプル、バイアル等に充填し、そのまま使用することもできるし、必要に応じて、凍結乾燥等を行うことも可能である。本発明の肝炎治療剤は、乾燥品の場合は、注射用蒸留水等に溶解して投与することができる。投与方法は、経口投与、静脈注射、吸入、経皮投与、点眼、局所投与、皮下投与等から適切な方法を選んで投与すればよい。本発明の肝炎の治療剤は、F a s リガンドに対する抗体ま

**[0034]**

An injection, a tablet, a capsule, a suppository, a spray, a cream agent, a poultice, eyedrops; etc. can be mentioned like the usual pharmaceutical or the pharmaceutical composition which contains an active ingredient as a formulation of the hepatitis therapeutic agent of this invention.

For example, as long as it prepares the solution which contains the concerned antibody if it is an injection, by the aseptic condition and there is necessity, it may add, making stabilizers, such as a mannitol, an filler, etc. as an assistant component.

This is filled to an ampoule, a vial, etc., and

Can also use then.

Freeze-dried etc. can also be performed depending on necessity.

In the case of the drying goods, the hepatitis therapeutic agent of this invention can be dissolved in the water for injection etc., and can administer.

The administration method chooses a suitable method out of oral administration, intravenous injection, inhalation, percutaneous administration, eyedropping, a local administration, a subcutaneous administration, etc., and should just administer it.

The therapeutic agent of the hepatitis of this

たはその活性フラグメントを有効成分として、通常、0.1～100重量%、好ましくは0.5～70重量%の割合で含有するものである。本発明の肝炎治療剤の投与量は、有効成分を基準として、ヒト成人1日あたり、通常、0.001～1000mg、好ましくは0.01～600mgである。もちろん、上記投与量は、一応の目安であり、患者の年齢、性別、体重、さらには疾患の種類とその程度に応じた投与量を適宜選択すればよい。

[0035]

## 【実施例】

以下に実施例を挙げて、本発明についてより具体的に説明する。

[0036]

## 【実施例1】

## (1) マウス肝細胞の調製

マウス肝細胞は、三井等編「機能細胞の分離と培養」(昭和62年1月30日丸善株式会社発行)第178～179頁に記載されているコラゲナーゼ灌流法を準用して分離した。すなわち、

(1)麻酔後、マウスを手術台に乗せ、手術用ハサミで皮膚、腹筋の順に開腹した。よくしぼったアルコール脱脂綿で腸を術者の右側にかきよけ、門脈を十分露出させた。

invention make an active ingredient the antibody with respect to Fas ligand, or its active fragment, and it is 0.1-100 weight% usually.

Preferably, it contains at a ratio of 0.5-70 weight%.

The dosage of the hepatitis remedy of this invention is as the reference standard set to the active ingredient, for a human adult, it is 0.001-1000 mg usually per day.

Preferably, it is 0.01-600 mg.

Of course, an above dosage is a general standard.

What is sufficient is just to select a dosage suitably depending on the kind and the its level of a patient's age, gender, a body weight, and also the disease.

[0035]

## 【Example】

An Example is given to below.

It more specifically about this invention explains.

[0036]

## 【Example 1】

## (1)

Preparation of a mouse hepatic cell

The mouse hepatic cell applied correspondingly and separated the collagenase perfusion method currently described in 78-179 pages of edition "separation of a functional cell, and culture" (January 30th, Showa 62 Maruzen Co., Ltd. K.K. issue) firsts, such as Mitsui & Co., Ltd.

That is

(1) The mouse was put on the operation table after anesthesia, and it performed laparotomy in the order of the skin and the abdominal muscle with surgical scissors.

With it, intestines were written to the right-hand side of an operator with the alcohol

(2)門脈に縫合糸のループをかけ眼科用ハサミの先端を使って門脈に切れ目を入れた。切開部から溢れ出る血液をカニユーレ先端から滴下する前灌流用緩衝液で洗い流しながら、すばやく門脈の切開面からカニユーレを挿入し、縫合糸で結紮した。同時に、肝臓下の下大静脈 (subhepatic inferior vena cava) を切断し、洗浄液を放出させた。そのまま30ml/minの流速でペリスタポンプを作動させ、37℃に保温した前灌流用緩衝液を灌流し続けた。

**【0037】**

(3)次に、胸廓部を開き、心臓を露出させた。横隔膜下の下大静脈 (thoracic inferior vena cava) に縫合糸のループをかけた後、右心房を眼科用ハサミで切開して別のカニユーレを右心房から下大静脈に挿入し結紮した。こうして、灌流液は、肝臓を循環し横隔膜下の下大静脈を流れ、新しく挿入したカニユーレを経由して、恒温槽内の瓶に戻り循環した。この状態で4～5分間灌流を続け、スムーズに灌流することを確認した上でポンプを止め、循環液をコラゲナーゼ溶液 (約100ml) に交換し再び灌流を始めた。8～10分間コラゲナーゼ溶液の灌流を続けると、肝臓は次第に消化され、肝小葉が浮き上がったような外観を呈し、表面から酵素液が滲出してきた。この状態で

absorbent cotton extracted well, and were avoided, and the sufficient exposure of the portal vein was carried out.

(2) The loop of a surgical suture was applied to the portal vein, and the cut was put into the portal vein using the end of ophthalmic scissors.

Flushing the blood which overflows from an incision part, by the buffer for a pre-perfusion dropped from a cannula end, cannula was quickly inserted from the section of the portal vein, and it ligated by the surgical suture.

The inferior vena cava under a liver (subhepatic inferior vena cava) was disconnected, and cleaning liquid was made to release simultaneously.

A peristaltic pump is made to operate by the flow rate of 30 ml/min then.

Before retain heating to 37 degrees-Celsius, perfusing buffer for a perfusion was continued.

**【0037】**

(3) Next, the chest was opened and the heart was exposed.

Ophthalmic scissors cut a right atrium open, and after applying the loop of a surgical suture to the inferior vena cava under a diaphragm (thoracic inferior vena cava), from the right atrium, another cannula was inserted in the inferior vena cava, and was ligated.

It carries out like this and

A perfusate circulates a liver and flows in the inferior vena cava under a diaphragm.

Via the cannula inserted newly

It returned and circulated into the bottle in a thermostat.

The 4-5 minutes perfusion was continued in this condition, the pump was stopped after having confirmed perfusing smoothly, and the circulation liquid was exchanged for the collagenase solution (about 100 ml), and the perfusion was begun again.

When continuing a perfusion of a 8-10 minutes collagenase solution, a liver is digested gradually and the exterior to which the lobulus hepatis came floating is presented.

The enzyme liquid has exuded from the surface.

灌流を中止し、肝臓各葉をスパーテルで受けつつ、ハサミで切り離しシャーレに移した。約10 ml のMEM (ニッスイ社製) 液を加え、手術用メスで軽く細分すると、消化された肝細胞がとろけるように分散した。次いで、30 ml MEMを加え、先太の駒込ピペットで軽く2~3回ピペッティングし、さらに細胞を分散させた後、2~3枚のガーゼを重ねた細胞濾過器で濾過した。

#### 【0038】

このようにして、まず、粗分散肝細胞浮遊液を調製した。次いで、この中からさらに肝実質細胞のみをとりだすために、以下の操作を行った。細胞浮遊液を50 ml 細胞遠心管に集め、卓上冷却遠心機で低速遠心 (50 × g, 1 min) した。この遠心条件では、肝実質細胞は、他の細胞に比し大きいので遠心管の底にパックされ、非実質細胞、損傷細胞、赤血球、細胞破片等は、沈殿しないで上清中に残る。上清を静かに駒込ピペットで除き、新たに細胞洗浄用緩衝液を加え、細胞を先太の駒込ピペットで軽く懸濁した後、同時に低速遠心した。この操作を3~4回繰り返すことにより、ほぼ均一な肝実質細胞を得ることができた。低速遠心操作後、得られた肝実質細胞の viability は、通常90%以上 (トリパン青の染色試験) で、その収量は  $4 \sim 6 \times 10^7$  細胞 / g 肝臓である。こうして得られたマウス肝細胞に対し、F a

While a perfusion is stopped by this state and each liver lobe is received by the spatula, It separated with scissors and it moved to the Petri dish.

When about 10 ml MEM (made by Nissui company) liquid was added and it subdivided lightly with the surgical scalpel, it dispersed so that the digested hepatic cell might be dissolved.

Subsequently, 30 ml MEM is added and a pipetting is lightly carried out 2-3 times by the Komagome type pipet with thick point.

Furthermore after making a cell disperse, it filtered by the cell filter which piled up 2-3 gauze.

#### [0038]

Thus, the rough dispersed hepatic-cell suspension was prepared first.

Subsequently, in order to take out only a hepatic parenchymal cell further out of this, the following operation was performed.

The cell suspension was brought together in 50 ml cell centrifuge tube, and low speed centrifugation (50\* g, 1min) was carried out by the desk-top refrigerated centrifuge.

On this centrifugation condition, a hepatic parenchymal cell is compared with another cell, and since it is large, it is packed at the bottom of a centrifuge tube.

A non-real cell, a damage cell, an erythrocyte, a cell broken piece, etc. remain in a supernatant liquid without precipitating.

After having added the buffer for cell washing newly except the supernatant liquid by the Komagome type pipet calmly and suspending a cell lightly by the Komagome type pipet with thick point, low speed centrifugation was carried out simultaneously.

The almost uniform hepatic parenchymal cell was able to be obtained by repeating this operation 3-4 times.

Viability of the obtained hepatic parenchymal cell is 90 % or more (dyeing test of tri pan blue) usually after low speed centrifugation operation, and the yield is  $4 \sim 6 \times 10^7$  cell / g liver.

In this way the cell damage of soluble Fas

sリガンドを導入したトランスフェクタントL5178Y-FasLの培養上清中に含まれる可溶性Fasリガンド(すなわち、sFasL)の細胞障害を検討した。

【0039】

(2) L5178Y-FasL

の調製

ヒトFasリガンドをL5178Yに導入する方法は、以下の通りである。すなわち、PMK i t Neoに組み込んだヒトFasリガンド遺伝子1μgに対し、Xho IとNot I (ペーリンガー社製)の制限酵素を各1単位加え、付属緩衝液を添加後、37℃にて2時間反応させた。この液について、1%アガロース電気泳動を行った。UV照射のもとでFasリガンドに相当する約850pbのバンドを切り出した。このアガロースゲルから、GENCLEAN IIキット(BIO101、フナコシ社製)を用いて、DNAを抽出した。すなわち、付属のNaI液をゲルに加え、65℃で10分間インキュベートし、ゲルを溶かした後、これにグラスミルク(glass milk)を加え5分間ローテートして、DNAを吸着させた。このグラスミルクをNew-WASH液で3回洗浄後、TE緩衝液10μlに懸濁し、65℃で3分間インキュベートすることによりDNAを溶出させた。次に、BCMGS<sub>neo</sub>のベクター1μgについても同様にXho IとNot Iで制限酵素処理を

ligand (that is, sFasL) contained in the culture supernatant liquid of transfectant L5178 Y-FasL which introduced Fas ligand with respect to the obtained mouse hepatic cell was examined.

[0039]

(2)

The method of introducing the preparation human Fas ligand of L5178 Y-FasL to L5178Y is the following passage.

That is, the restriction enzyme of Xho I and Not I (product made from a Boehringer Co., Ltd) with respect to human Fas ligand gene 1 micro-g inserted in PMK i t Neo, one unit each added, Attached buffer was made to react for 2 hours by 37 degrees-Celsius after adding.

About this liquid, the agarose electrophoresis was performed 1%.

The band of about 850 pbs which are equivalent to Fas ligand under a UV irradiation was cut down.

From this agarose gel to GENCLEAN DNA was extracted using II kit (BIO101, made by a Funakoshi company).

That is, attached NaI liquid is added to gel and 10 minutes is incubated by 65 degrees-Celsius. After dissolving gel, glass milk (glassmilk) is added to this and 5 minutes rotates.

DNA was made to absorb.

This glass milk is suspended to TE buffer 10 microliter after 3 times washing with a New-WASH liquid.

DNA was made to elute by incubating 3 minutes by 65 degrees-Celsius.

Next, a limited enzyme treatment is similarly carried out by Xho I and Not I about vector 1 micro-g of BCMGS<sub>neo</sub>. After carrying out an agarose gel electrophoresis 0.75%, it refined using GENECLEANII kit.

行い、0.75%アガロースゲル電気泳動を行った後、GENE CLEAN II キットを用いて精製した。

#### 【0040】

次に、Fas リガンドと DNA と BCMGS<sub>neo</sub> のベクターのライゲーションをベクター:cDNA=1:2 (モル比) になるように混合し、宝酒造社製 DNA ライゲーションキットを用いて、16℃で16時間反応させて、ライゲーションした。この反応液を、大腸菌コンピテントセル (東洋紡社製) と混合して、氷上で30分間、42℃で40秒間インキュベートすることにより、DNA を大腸菌へ導入した。これに対し、SOC 培地を加え、37℃で1時間振盪培養後、アンピシリン入りの LB 寒天培地に分注し37℃にて1日間培養した。その後、出現したコロニーを LB 培地で37℃で1日間培養した後、アルカリ法にて、プラスミド (ヒト Fas リガンド-BCMGS<sub>neo</sub>) を回収した。

#### 【0041】

このヒト Fas リガンド-BCMGS<sub>neo</sub> 1μg について、L5178Y 細胞 1×10<sup>6</sup> 個に対し、エレクトロポレーション法にて、遺伝子導入を行った。条件は、ジーンパルサー (パイオラッド社製) を用い、296V、960μF で実施した。この細胞を再度 10% FCS-RPMI 1640 培地 5ml に懸濁した。6well プレートに、こ

#### 【0040】

Next, the ligation of Fas ligand and the vector of DNA and BCMGS<sub>neo</sub> is mixed so that it may be set to vector:cDNA=1:2 (molar ratio), and using the Takara-Shuzo company DNA ligation kit, by 16 degrees-Celsius, it was made to react for 16 hours and the ligation was carried out.

This reaction solution was mixed with the Escherichia-coli competent cell (made by a Toyobo company), and DNA was introduced to the Escherichia coli by incubating for 40 seconds by 30 minutes and 42 degrees-Celsius by the on ice.

On the other hand, SOC culture medium is added, and it dispensed to the thing LB agar medium including an ampicillin after the 1 hour shaking culture by 37 degrees-Celsius, and it cultivated for 1 day by 37 degrees-Celsius.

After cultivating the colony which appeared, for 1 day by 37 degrees-Celsius by LB culture medium after that, the plasmid (human Fas ligand- BCMGS<sub>neo</sub>) was collected by the alkaline process.

#### 【0041】

About this human Fas ligand- BCMGS<sub>neo</sub> 1 micro-g, the gene transfer was performed by the electroporation method with respect to 1\*10<sup>6</sup> piece of L5178Y cells.

Conditions were performed by 296V and 960 micro-F using the gene pulser (made by a BIORAD company).

This cell was again suspended to 5 ml of 10% FCS-RPMI1640 culture mediums.

It cultivated by putting the liquid of this cell into 6well plate.

However, at this time, G418 (made by GIBCO company) was added to the culture medium so

の細胞の液を入れて培養を行ったが、この時、G418 (GIBCO社製) を  $0.4 \text{ mg/ml}$  になるように培地に添加した。10日間の培養後、コロニーが得られたので、限界希釈法により、細胞をクローニングした。得られたクローンについて、ノーザンハイブリダイゼーション法によりヒト Fas リガンドの mRNA の濃度が一番高いものに選別し、培養した。これを Fas リガンド-L5178Y 細胞 (すなわち、L5178Y-FasL) とした。

#### 【0042】

##### (3) マウス肝細胞に対する FasL の細胞障害性の検討

##### (1) 可溶性 FasL (sFasL) の調製

L5178Y-FasL を  $75 \text{ cm}^2$  の培養フラスコを用いて  $5 \times 10^5$  個/ml の濃度で 10% FCS・RPMI 1640 培地  $30 \text{ ml}$  で4日間培養し、培養上清を回収した。回収した培養上清 (sFasL) は、 $0.45 \mu\text{m}$  のフィルターで滅菌し、保存した。

##### (2) ターゲット細胞の調製

細胞は、(1) で調製した肝実質細胞を 10% FCS・L-15 培地にて  $2 \times 10^5$  個/ml に調製した。

#### 【0043】

##### (3) アッセイ

(1) で調製した sFasL 分子を 10% FCS・RPMI 1640 培地で 12 倍に希釈した。96 ウェル平底プレート (コー

that it might be set to  $0.4 \text{ mg/ml}$ .

For 10 days after cultivating, since the colony was obtained, the cell was cloned with the threshold dilution method.

About the obtained clone, the concentration of mRNA of a human Fas ligand selects highness most by the Northern-hybridization method.

It cultivated.

This was made into the Fas ligand- L5178Y cell (that is, L5178 Y-FasL).

#### [0042]

##### (3)

Cytotoxic study of FasL with respect to a mouse hepatic cell

##### (1) Preparation of soluble FasL (sFasL)

L5178 Y-FasL will be cultivated for 4 days by  $30 \text{ ml}$  of 10% FCS・RPMI1640 culture mediums by  $5 \times 10^5$  piece/ml concentration using a  $75\text{-cm}^2$  squared culture flask.

The culture supernatant liquid was collected. The collected culture supernatant liquid (sFasL) sterilizes with the filter of  $0.45 \mu\text{m}$ .

It preserved.

(2) The preparation cell of a target cell prepared the hepatic parenchymal cell prepared by (1) to  $2 \times 10^5$  piece/ml by 10% FCS・L-15 culture medium.

#### [0043]

##### (3) Assay

sFasL molecule prepared by (1) was diluted 12 times by 10% FCS・RPMI1640 culture medium.

Using 96 well flat bottom plate (made by Corning Incorporated), to each well this added

ニング社製)を用い、各ウェルにこの希釈液  $25\mu\text{l}$  加えた。次いで、 $10\%$  FCS・L-15 培地を  $25\mu\text{l}$  加えた。また、比較対象として、抗マウス Fas 抗体 (Jo-2 : ファーミンジェン社製) を  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で  $25\mu\text{l}$  加えたもの、さらには TNF (シグマ社製) を  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  で  $25\mu\text{l}$  加えたものを用いた。このプレート各ウェルに  $50\mu\text{l}$  の (2) で調製したターゲットを入れた。その後、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  の環境下のもとで 12 時間インキュベートした。次いで、アラマーブルー (Alamar blue<sup>TM</sup>、コスモバイオ社製) を  $10\mu\text{l}$  加え、さらに  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  下にて 4 時間反応させた。その後、フロオロスキャン II (タイターテック社製) を用いて蛍光量を測定した。その結果をまとめたものを表 1 に示す。表 1 から明らかのように、肝実質細胞は、sFasL に対してのみ viability (生存率) が低下した。

[0044]

[表 1]

dilution-liquid 25 microliter.

Subsequently,  $10\%$  FCS<sup>\*</sup>L-15 culture medium was added 25 microliters.

Moreover, that which added the anti- mouse Fas antibody (Jo-2 : made by Pharmingen company) 25 microliters by  $10\text{ micro-g/ml}$  concentration, and the thing which added TNF (made in a sigma company) 25 microliters by  $10\text{ micro-g/ml}$  were used as a comparison object.

The target prepared by (2) of 50 microliters was put into each well of this plate.

After that, it incubated for 12 hours  $37\text{ degrees-Celsius}$  and under the environment of  $5\% \text{ CO}_2$ .

Subsequently, offal multiple-independently-targetable-reentry-vehicle roux (Alamar blue<sup>TM</sup>, made in a Cosmo-Bio company) is added 10 microliters. Furthermore it was made to react for 4 hours under  $37\text{ degrees-Celsius}$  and  $5\% \text{ CO}_2$ .

After that, fluorescent quantity was measured using fluoro scan II (made by a titer tech company).

That which collected the result is shown to Table 1.

As for the hepatic parenchymal cell, viability (survival rate) reduced from Table 1 only to sFasL clearly.

[0044]

[Table 1]



添加剤	生存率 (%)
未添加	100
sFasL	0.5
抗Fas抗体	99
TNF	98

Additives	Survival rate (%)
-----------	-------------------

No additives	
--------------	--

...	
-----	--

Anti- Fas antibody	
--------------------	--

...	
-----	--

#### 【0045】

##### (4) マウス肝細胞に対する FasL の細胞障害における抗ヒト FasL 抗体の効果

前述のごとく、FasL は、肝実質細胞に対し、細胞障害性を示すことが分かったので、次に、この細胞障害反応が抗ヒト FasL 抗体で阻害できるかどうかについて検討を加えた。すなわち、(3) と同様の系において実施した。前記 (3) の (1) で調製した sFasL を 10% FCS・RPMI 1640 培地で 12 倍に希釈した。96 ウェル平底プレートを用い、各ウェルにこの希釈液を 25  $\mu$ l 加えた。次いで、10% FCS・L15 培地にて 10  $\mu$ g/ml に希釈した抗ヒト FasL 抗体 (NOK 1) を 25  $\mu$ l 加え、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下にて 1 時間インキュベートした。次に、肝実質細胞 2 × 10<sup>5</sup> 個/ml を 50  $\mu$ l / ウェル加えた。3

#### [0045]

##### (4)

The effect of the anti-human FasL antibody in the cell damage of FasL with respect to a mouse hepatic cell

As mentioned above, it was found that FasL shows cytotoxicity with respect to a hepatic parenchymal cell. Next, study was added about the ability of this cell-damage reaction to be able to obstruct by the anti-human FasL antibody.

That is, it was performed in the system similar to (3).

SFasL prepared by (1) of above-mentioned (3) was diluted 12 times by 10% FCS・RPMI1640 culture medium.

This dilution liquid was added to each well 25 microliters using 96 well flat bottom plate.

Subsequently, the anti-human FasL antibody (NOK 1) diluted to 10 micro-g/ml was added 25 microliters by 10% FCS・L15 culture medium, and 1 hour incubation was carried out under 37 degrees-Celsius and 5% CO<sub>2</sub>.

Next, they are a 2\*10<sup>5</sup> piece/ml hepatic parenchymal cell 50 micro-s / well added.

It incubated for 12 hours under 37 degrees-Celsius and 5% CO<sub>2</sub>.

Subsequently, offal multiple-independently-

Apoptosis of a hepatic cell was clearly suppressed by addition of an anti-FasL antibody from Table 2.

**[0046]**

**[Table 2]**

Additives	Survival rate (%)
No additives	100
...	...
... Anti- FasL antibody	100

That is, in the experiment system of vitro, it has confirmed that an anti- FasL antibody could suppress apoptosis of the hepatic cell through FasL.

【0047】

(5) SCIDマウスにおける  
実験的肝炎モデル系における抗  
FasL抗体投与による肝炎の  
抑制の検討

SCIDマウス(8週齢のメス、チャールズリバー社製)1匹あたり、ヒトの末梢血単核細胞(PBMC)を $5 \times 10^7$ 個を1mlのPBSに懸濁したものを腹腔内に投与した。次いで、6時間ないし12時間後にD-ガラクトサミン(ワコー社製)20mgとSEB(Staphylococcal enterotoxin B)(シグマ社製)10 $\mu$ gをPBS1mlに懸濁したものをさらに腹腔内に投与した。なお、抗FasL抗体を投与する場合は、D-ガラクトサミン、SEB投与30分前に、500 $\mu$ gを腹腔投与した。その後、12時間後における血中のGOT(グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ)及びGPT(グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ)の濃度を測定するとともに、24時間後の肝細胞の染色を行った。その結果、抗FasL抗体投与群は、24時間後に、コントロールの非投与群に比べ、有意に生存が認められた。また、12時間後のGOTとGPTの量は、コントロールに比べて2桁違いの値となり、正常に近いほどに回復しているのが認められた。結果を表3に示す。

【0048】

[0047]

(5)

Study of inhibition of the hepatitis by the anti-FasL antibody administration in the experimental hepatitis model system in SCID mouse

That which suspended in 1 ml PBS  $5 \times 10^7$  piece of human's peripheral-blood mononuclear cell (PBMC) per 1 animal (a 8-week-old female, made by Charles River company) of SCID mice was administered to intraperitoneal.

Subsequently, 6 hour thru 12 hours after D-galactosamine (made in Wako company) 20 mg, and SEB (that which suspended Staphylococcal enterotoxin B)(made in sigma company) 10 micro-g to PBS 1 ml furthermore, administered to the inside of an abdomen.

In addition, when administering an anti-FasL antibody, the abdominal-cavity administration of the 500 micro-g was carried out 30 minutes before D-galactosamine and SEB administration.

After that, while blood concentration of GOT (glutamic-acid-oxalacetic-acid transaminase) and GPT (glutamic-acid-pyruvic-acid transaminase) after 12 hours was measured, coloring of the hepatic cell after 24 hours was performed.

As a result, as for the anti-FasL antibody administration group, survival observed significantly 24 hours after compared with the group of control non-administering a medicine for the patient.

Moreover, the quantity of GOT and GPT after 12 hours, comparing to control, became the value with difference of 2 digits, having recovered observed so that it was normally near.

A result is shown to Table 3.

[0048]

【表 3】

[Table 3]

抗 FasL 抗体	生存数	GOT	GPT
+	4/4	350	210
-	0/4	>10000	>10000

Anti- FasL antibody      Survival rate

この結果、本発明のヒトの Fas リガンドに対する抗体の投与は、肝炎の治療剤として有効であることが実証できた。

Consequently, it has been proved that the administration of the antibody with respect to Fas ligand of the human of this invention was effective as a therapeutic agent of a hepatitis.

【0049】

[0049]

## 【参考例 1】

## 抗 FasL 抗体の V 領域遺伝子シーケンス

ハイブリドーマ NOK 1~5 を用いて、下記のプロトコールにより Fas リガンドに対するモノクローナル抗体の可変領域 (V 領域) の遺伝子シーケンスを行った。

## 1. cDNA の調製

(1) ハイブリドーマ NOK 1~5 のそれぞれを 25 cm<sup>3</sup> フラスコ中で培養した。培養細胞を回収して、PBS で遠心洗浄した後、1 ml の PBS に懸濁し、細胞数を数えた。細胞 1 × 10<sup>6</sup> 個を無菌のエッペンドルフチューブに入れ、遠心分離で上清を抜き取り、ペレットをタ

## [Reference Example 1]

V region gene sequence of an anti- FasL antibody

The following protocol performed the gene sequence of the variable region (V region) of the monoclonal antibody with respect to Fas ligand using hybridoma NOK 1-5.

## 1. Preparation of cDNA

(1)

Each of hybridoma NOK 1-5 was cultivated in the 25 cm<sup>3</sup> flask.

A culture cell is collected.

After carrying out centrifugal washing by PBS, it suspends to 1 ml PBS.

The number of cells was counted.

1 × 10<sup>6</sup> piece of cells is put into a sterile Eppendorf tube.

The supernatant liquid was sampled by the centrifugation and the pellet was tapped.

(2)

RNAZO1B (made by Cosmo Bio) was added 200 microliters, it stirred by the chip of a pipet

ッピングした。

(2) RNA<sub>201</sub>B (コスモバイオ製) を 200  $\mu$ l 加え、ピペットマンのチップでよく攪拌して細胞を溶かした。クロロホルムを 20  $\mu$ l 添加し、振盪後、氷中に 5 分間放置した。4℃で 15,000 rpm、15 分間遠心した後、上層の無色透明の部分を回収し、新しいチューブに移した。4℃で 15,000 rpm、15 分間遠心した後、上清を捨てて、ペレットに 75% エタノールを 800  $\mu$ l 加え、-20℃で 30 分間放置した。4℃で 15,000 rpm、15 分間遠心した後、ペレットに蒸留水 11.5  $\mu$ l 添加した。

(3) オリゴ dT (0.5 mg/ml) を 0.5  $\mu$ l 添加して、70℃で 10 分間、氷上で 5 分間放置した。

man being sufficient, and the cell was dissolved. 20 microliter addition of chloroform is carried out.

5 minutes was left after shaking and in ice.

After centrifuging 15 minutes 15,000 rpm by 4 degrees-Celsius, the upper colorless and transparent part was collected and it moved to the new tube.

After centrifuging 15 minutes 15,000 rpm by 4 degrees-Celsius, the supernatant liquid was thrown away, the ethanol was added to the pellet 800 microliters 75%, and 30 minutes was left by -20 degrees-Celsius.

After centrifuging 15 minutes 15,000 rpm by 4 degrees-Celsius, distilled-water 11.5 microliter addition was carried out at the pellet.

(3)

Oligo dT (P. 5 mg/ml) 0.5 microliter addition is carried out.

5 minutes was left by 10 minutes and the on ice by 70 degrees-Celsius.

[0050]

[0050]

【表 4】

[Table 4]

5xRT buffer	4 $\mu$ l
10mM dNTPmix	1 $\mu$ l
Superscript RTase	1 $\mu$ l
(Stratagene製)	

...  
(Made by ...)

を加え、42℃で50分間、90℃で5分間、氷上で5分間放置した。

(4) RNaseHを1μl添加し、37℃で20分間放置した。このようにして、cDNA混合物を調製した。

This is added, and it was left by 50 minutes by 42 degrees-Celsius, and 5 minutes was left by 5 minutes and the on ice by 90 degrees-Celsius.

(4) 1 microliter addition of the RNaseH is carried out.

20 minutes was left by 37 degrees-Celsius. Thus, cDNA mixture was prepared.

**【0051】**

**2. PCR反応**

(1) 前記で得られたcDNAを用い、下記の条件でPCR反応を行った。

**[0051]**

**2. PCR reaction**

(1)

PCR reaction was performed on condition that the following using cDNA obtained by the above-mentioned.

**【0052】**

**[0052]**

**【表5】**

**[Table 5]**

	VH	VL
cDNA	2 μl	2 μl
dNTPmix	1 μl	1 μl
primer	2 μl	1 μl
(Pharmacia製)		
10xPCR buffer	4 μl	4 μl
DDW	30.5 μl	31.5 μl
Ampli-Tag	0.5 μl	0.5 μl

...  
(Made by ...)

**【0053】**

ミネラルオイル40μlを重層し、94℃で5分間放置した後、55℃で2分間、72℃

**[0053]**

Mineral-oil 40 microliter is stratified.

By 95 degrees-Celsius after leaving 5 minutes by 94 degrees-Celsius, 3 minutes was

で3分間、94℃で1分間」のサイクルを30サイクル行い、次いで、55℃で2分間、72℃で10分間放置した。

(2) 反応液4  $\mu$ lをミニゲル電気泳動(1.5%アガロースゲル)でチェックした。結果を図1に示す。モノクローナル抗体NOK3のL鎖を除いて、PCRによりDNA断片が増幅したことが確認された。

#### 【0054】

##### 3. VH及びVLフラグメントの回収

(1) 上記で調製したPCR生成物をミニゲル電気泳動(1.5%アガロースゲル)させて、VH(H鎖V領域)及びVL(L鎖V領域)のバンドをゲルから切り出した。

(2) Gene CleanでPCR生成物を回収し、ミニゲル電気泳動(1.5%アガロースゲル)でバンドをチェックした。例として、NOK4のVHについての結果を図2に示す。

#### 【0055】

##### 4. ライゲーション

下記TAクローニングキットを用い、DNAの連結反応(Ligation)を行った。

#### 【0056】

#### 【表6】

performed by 2 minutes and 72 degrees-Celsius, 94 degrees-Celsius performed 30 cycles of the cycles of 1 minute", and 10 minutes was left by 2 minutes and 72 degrees-Celsius by 55 degrees-Celsius then.

(2)

Reaction-solution 4 microliter was checked by the mini gel electrophoresis (1.5% agarose gel).

A result is shown to Figure 1.

The L chain of monoclonal-antibody NOK 3 is excluded.

It was checked that the DNA fragment had amplified by PCR.

#### [0054]

##### 3. Collection of VH and VL fragment

(1)

The mini gel electrophoresis (1.5% agarose gel) of the PCR product prepared by the above is carried out.

The band of VH (heavy-chain V region) and VL (L-chain V region) was cut down from the gel.

(2)

Gene PCR product is collected by Clean.

The band was checked by the mini gel electrophoresis (1.5% agarose gel).

As an example, the result about VH of NOK 4 is shown to Figure 2.

#### [0055]

##### 4. Ligation

The ligation (Ligation) of DNA was performed using following TA cloning kit.

#### [0056]

#### [Table 6]

ADDW	5 $\mu$ l
10xLigation buffer	1 $\mu$ l
PCRベクター	2 $\mu$ l
PCR生成物	1 $\mu$ l
T4DNA Ligase	1 $\mu$ l
...	
PCR Vector	
PCR product	
...	

14℃で一晩反応を行い、ライゲーション混合物を得た。

Night reaction was performed by 14 degrees-Celsius, and the ligation mixture was obtained.

**[0057]**

5. トランスフォーメーション  
TAクローニングキットを用いて形質転換 (Transformation) を行った。

(1) 氷上で細胞50  $\mu$  lに、0.5Mの $\beta$ メルカプトエタノール2  $\mu$  l、及び前記で調製したライゲーション混合物を添加し30分間放置した後、42℃の湯浴中に30秒間、次いで、氷上に20分間放置した。450  $\mu$  lのSOC培地を加え、37℃で1時間 (225 rpm) インキュベートした。

(2) 次いで、LB agarプレート (+Amp, X-Gal, IPTG) に拡散した。各サンプルは、50  $\mu$  l、100  $\mu$  l、200  $\mu$  lであった。37℃で18時間インキュベートした後、4℃で2時間放置したところ、白と青のコロニーが発現した。

**[0057]**

5. It transformed using the transformation TA cloning kit (Transformation).

(1)

After having added mercaptoethanol (beta) 2 microliter of 0.5M, and the ligation mixture prepared by the above-mentioned to cell 50 microliter and leaving 30 minutes in it by the on ice, 20 minutes was left then for 30 seconds in 42 degrees-Celsius water bath at the on ice.

SOC culture medium of 450 microliters was added and 1 hour (225 rpm) incubation was carried out by 37 degrees-Celsius.

(2)

Subsequently, LB It diffused on agar plate (+Amp, X-s Gal and IPTG).

Each sample was 50 microliter, 100 microliter, and 200 microliter.

After incubating for 18 hours by 37 degrees-Celsius, when it was left for 2 hours by 4 degrees-Celsius, the colony of white and blue expressed.



## 【0058】

## 6. ミニ培養 (Mini Culture)

(1) 前記各サンプルのプレートから白いコロニーを4個ずつ拾った。

(2) 3 ml のLB培地 (+Amp) に1個のコロニーを加え、37℃で一晩振盪した。

## 【0059】

## 7. ミニ調製 (Mini Preparation)

(1) 培養溶液 1.5 ml をエッペンドルフチューブに取った。(保存用としてLBプレートに拡散して37℃で培養した。) 4℃で6,000 rpm、2分間遠心した。

(2) ppt. + 100  $\mu$ l 溶液 1 (リゾチーム 5 mg/ml) を加え、室温で5分間放置した後、200  $\mu$ l の溶液 2 (氷上で穏やかに5分間混合) を添加し、150  $\mu$ l の溶液 3 (氷上で15分間混合) を添加し、次いで、4℃で12,000 rpm、5分間遠心した。

(3) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、等容量のフェノールを添加し、次いで、室温で12,000 rpm、1分間遠心した。

## 【0060】

(4) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、等容量のCHCl<sub>3</sub>:iAA (99:1) 混合物を加え、室温で12,000 rpm、1分間遠心した。

## [0058]

## 6. Mini-culture (Mini Culture)

(1)

It gathered the 4-piece white colony respectively from the plate of each above-mentioned sample.

(2)

The 1-piece colony was added to 3 ml LB culture medium (+Amp), and it carried out night shaking by 37 degrees-Celsius.

## [0059]

## 7. Mini-preparation (Mini Preparation)

(1)

1.5 ml of culture solutions was taken in the Eppendorf tube.

(for preservation, it diffused on LB plate and it cultivated by 37 degrees-Celsius)

2 minutes was centrifuged 6,000 rpm by 4 degrees-Celsius.

(2)

The ppt.+100 microliter solution 1 (lysozyme 5 mg/ml) is added, and it is room temperature, and after leaving 5 minutes, the solution 2 (5 minutes is quietly mixed by the on ice) of 200 microliter is added.

The solution 3 (15 minutes is mixed by the on ice) of 150 microliters is added.

Subsequently, 5 minutes was centrifuged 12,000 rpm by 4 degrees-Celsius.

(3)

The supernatant liquid was taken in the new Eppendorf tube.

The phenol of equal volumes is added to this.

Subsequently, it was room temperature and 1 minute was centrifuged 12,000 rpm.

## [0060]

(4)

The supernatant liquid was taken in the new Eppendorf tube.

The CHCl<sub>3</sub>:iAA (99:1) mixture of equal volumes is added to this, and it was room temperature and 1 minute was centrifuged 12,000 rpm.

(5) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、 $1\mu\text{l}$ のMusselグリコーゲンと $900\mu\text{l}$ のエタノールを添加し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で30分間放置した後、 $4^{\circ}\text{C}$ で15,000rpm、5分間遠心した。

(6) 沈殿物を乾燥した。 $20\mu\text{l}$ のTE及び $1\mu\text{l}$ のRNase A (5mg/ml)を加え、 $65^{\circ}\text{C}$ で20分間放置した。

(7) このようにして、プラスミドDNAを得た、

(8) 下記の条件でミニゲル電気泳動を行い、バンドをチェックした。NOK 4VL、NOK 5VH、NOK 5VLの結果を図3に示す。

(5)

The supernatant liquid was taken in the new Eppendorf tube.

To this, Mussel glycogen of 1 microliter and the ethanol of 900 microliters are added.

After leaving 30 minutes by  $-80^{\circ}\text{C}$  degrees-Celsius, 5 minutes was centrifuged 15,000 rpm by  $4^{\circ}\text{C}$  degrees-Celsius.

(6)

The precipitate was dried.

TE of 20 microliters, and RNase of 1 microliter A (5 mg/ml) was added and 20 minutes was left by  $65^{\circ}\text{C}$  degrees-Celsius.

(7)

Thus, plasmid DNA was obtained.

(8)

The mini gel electrophoresis was performed on condition that the following, and the band was checked.

The result of NOK 4VL, NOK 5VH, and NOK 5VL is shown to Figure 3.

[0061]

[0061]

[表7]

[Table 7]

H Buf.	$1\mu\text{l}$
EcoRI	$1\mu\text{l}$ (IU)
DNA	$1\mu\text{l}$
ADDW	$7\mu\text{l}$

$37^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートした後、0.75%アガロースゲルに加えて電気泳動を行った。

After carrying out 1 hour incubation by  $37^{\circ}\text{C}$  degrees-Celsius, in addition to the agarose gel, the electrophoresis was performed 0.75%.

## 【0062】

8. DNAシーケンス

(1) プラスミドNDAを1  $\mu$  lとり、99  $\mu$  lのTEにて希釈した。

(2) A260を測定し、DNA値を計算した (A260 of 1.0 = 50  $\mu$ g/ml)。

(3) A260値より、DNAが1  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTEにて希釈した。

(4) Dyeターミネーター法により、DNAシーケンス (ABIモデル373A) を行った。

## [0062]

## 8. DNA sequence

(1)

The plasmid NDA was taken 1 microliter and it diluted by TE of 99 microliter.

(2)

A260 is measured.

The DNA value was calculated (A260 of 1.0 = 50 micro-g/ml).

(3)

From A260 value, DNA diluted by TE so as to become 1 micro-s g/microliter.

(4)

By Dye terminator method, it is the DNA sequence (ABI model 373 A) was performed).

## 【0063】

9. V領域の解析

このようにして得られたDNAシーケンスをもとに、V領域のアミノ酸配列をコンピュータ解析により求めた。結果を図4 (モノクローナル抗体NOK 1~5のVH領域のアミノ酸配列)、及び図5 (モノクローナル抗体NOK 1、2、4、5のVL領域のアミノ酸配列) に示す。これらの図において、四角の線で囲った箇所は、超可変領域 (CDR 1~3) である。

## [0063]

## 9. Analysis of V region

Thus on the basis of the obtained DNA sequence, it calculated for the amino acid sequence of V region in the computer analysis.

A result is shown to Figure 4 (amino acid sequence of VH region of monoclonal-antibody NOK 1-5), and 5 (amino acid sequence of VL region of monoclonal-antibody NOK 1, 2, 4, and 5).

These figures.

WHEREIN, the part enclosed with the square line is a hypervariable region (CDR 1-3).

## 【0064】

## 【発明の効果】

以上説明したように、本発明の肝炎治療剤は、肝炎治療に有用である。とりわけ、本発明の肝炎治療剤は、肝実質細胞がアポトーシスにより死ぬことにより発症する肝炎に有効となる。その理由は、本発明の肝炎治療剤

## [0064]

## [EFFECT OF THE INVENTION]

As explained above, the hepatitis therapeutic agent of this invention is useful to the hepatitis treatment.

Especially, the hepatitis therapeutic agent of this invention consists the hepatitis developed when a hepatic parenchymal cell dies by apoptosis with effectiveness.

As for the reason, the hepatitis therapeutic

は、F a s L と F a s を介した  
肝実質細胞のアポトーシスを抑  
制するからである。

agent of this invention suppresses apoptosis of  
the hepatic parenchymal cell through FasL and  
Fas.

【0065】

[0065]

## 【配列表】

配列番号：1  
 配列の長さ：120  
 配列の型：アミノ酸  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：ペプチド  
 配列  
 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly  
 Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 Ser  
 1 15 5  
 10 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser  
 Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser Trp  
 20  
 25 30  
 Met Asn Trp Val Lys Gln Arg  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 Gly  
 35  
 40 45  
 Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp  
 Thr Asn Asp Asn Gly Lys Phe  
 Lys  
 50 55  
 60 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp  
 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met  
 65 70  
 75 80  
 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser  
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe  
 Cys Ala  
 85  
 90 95  
 Arg Ser Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser  
 Pro Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln  
 100  
 105 110

## [Sequence table]

Sequence number: 1  
 Length of a sequence: 120  
 Sequence-type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Kind of sequence: Peptide  
 Sequence  
 ValGlnLeuGlnGluSerGlyProGluLeuValLysProGlyAlaSer  
 1 5 10  
 15  
 ValLysIleSerCysLysAlaSerGlyTyrAlaPheSerSer  
 SerTrp  
 20 25  
 30  
 MetAsnTrpValLysGlnArgProGlyLysGlyLeuGluTrpIleGly  
 35 40  
 45  
 ArgIleTyrProGlyAspGlyAspThrAsnAspAsnGlyLysPheLys  
 50 55  
 60  
 GlyLysAlaThrLeuThrAlaAspLysSerSerSerThrAlaTyrMet  
 65 70  
 75 80  
 GlnLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrPheCysAla  
 85 90 95  
 ArgSerTyrTyrTyrAspGlySerProTrpPheThrTyrTrpGlyGln  
 100 105  
 110  
 GlyThrThrValThrValSerSer  
 115 120

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

## 【0066】

配列番号: 2

配列の長さ: 360

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to

mRNA

起源

マウス

配列の特徴:

特徴を決定した方法: E

配列

GTG CAG CTG CAG GAG TCT  
 GGA CCT GAG CTG GTG  
 AAG CCT GGG GCC TCA  
 48

GTG AAG ATT TCC TGC AAG  
 GCT TCT GGC TAT GCA TTC  
 AGT AGC TCC TGG 96

ATG AAC TGG GTG AAG CAG  
 AGG CCT GGA AAG GGT CTT  
 GAG TGG ATT GGA 144

CGA ATT TAT CCT GGA GAT  
 GGA GAT ACT AAC GAC AAC  
 GGG AAG TTC AAG 192

GGC AAG GCC ACA CTG  
 ACC GCA GAC AAA TCC TCC  
 AGC ACA GCC TAC ATG  
 240

CAA CTC AGC AGT CTG ACA  
 TCT GAG GAC TCT GCG GTC  
 TAC TTC TGT GCA 288

AGA TCG TAT TAC TAC GAT  
 GGT AGC CCC TGG TTT ACT  
 TAC TGG GGC CAA 336

GGG ACC ACG GTC ACC  
 GTC TCC TCA  
 360

## 【0067】

## [0066]

Sequence number: 2

Length of a sequence: 360

Sequence type: Nucleic acid

The number of chains: It is double stranded.

Topology: Linear

Kind of sequence: cDNA to mRNA

Origin

Mouse

The characteristic of a sequence:

Method to have determined the characteristic:

E

Sequence

GTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCT  
 GGTGAAGCCTGGGGCCTCA 48

GTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTAT  
 GCATTCACTAGCTCCTGG 96

ATGAAGTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGAAA  
 GGGTCTTGAGTGGATTGGA 144

CGAATTTATCCTGGAGATGGAGATACTAACG  
 ACAACGGGAAGTTCAAG 192

GGCAAGGCCACACTGACCGCAGACAAATC  
 CTCCAGCACAGCCTACATG 240

CAACTCAGCAGTCTGACATCTGAGGACTCT  
 GCGGTCTACTTCTGTGCA 288

AGATCGTATTACTACGATGGTAGCCCCTGGT  
 TTAATTACTGGGGCCAA 336

GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA  
 360

## [0067]

配列番号: 3  
 配列の長さ: 108  
 配列の型: アミノ酸  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: ペプチド

配列

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro  
 Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu  
 Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg  
 Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys  
 Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu  
 Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
 Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser  
 Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys  
 Gln Gln Tyr Ser Glu Phe Pro  
 Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

【0068】

配列番号: 4  
 配列の長さ: 324  
 配列の型: 核酸  
 鎖の数: 二本鎖  
 トポロジー: 直鎖状

Sequence number: 3  
 Length of a sequence: 108  
 Sequence-type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Kind of sequence: Peptide

Sequence

AspIleGlnMetThrGlnSerProSerSerLeuSerAlaSerLeuGly

1 5 10 15

AspArgValThrIleSerCysArgAlaSerGlnAspIleSerAsnTyr

20 25 30

LeuAsnTrpTyrGlnGlnLysProAspGlyThrValLysLeuLeulle

35 40 45

TyrTyrThrSerArgLeuHisSerGlyValProSerArgPheSerGly

50 55 60

SerGlySerGlyThrAspTyrSerLeuThrIleSerAsnLeuGluPro

65 70 75 80

GluAspIleAlaThrTyrPheCysGlnGlnTyrSerGluPheProTrp

85 90 95 100 105

ThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGluIleLysArg

100 105

[0068]

Sequence number: 4  
 Length of a sequence: 324  
 Sequence-type: Nucleic acid  
 The number of chains: It is double stranded.  
 Topology: Linear  
 Kind of sequence: cDNA to mRNA

配列の種類 : cDNA to  
mRNA

起源

マウス

配列の特徴 :

特徴を決定した方法 : E

配列

GAC ATC CAG ATG ACG CAG  
TCT CCA TCC TCC CTG TCT  
GCC TCT CTG GGA 48  
GAC AGA GTC ACC ATC AGT  
TGC AGG GCA AGT CAG GAT  
ATT AGC AAT TAT 96  
TTA AAC TGG TAT CAG CAG  
AAA CCA GAT GGA ACT GTT  
AAA CTC CTG ATC 144  
TAC TAC ACA TCA AGA TTA  
CAC TCA GGA GTC CCA TCA  
AGG TTC AGT GGC 192  
AGT GGG TCT GGG ACA GAT  
TAT TCT CTC ACC ATC AGC  
AAC CTG GAA CCT 240  
GAA GAT ATT GCC ACT TAC  
TTT TGT CAG CAA TAT AGT  
GAA TTT CCG TGG 288  
ACG TTC GGT GGA GGC  
ACC AAG CTG GAA ATC AAA  
CGG 324

【0069】

配列番号 : 5

配列の長さ : 118

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala  
Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser  
1 5  
10 15  
Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala  
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp  
20  
25 30  
Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro

Origin

Mouse

The characteristic of a sequence :

Method to have determined the characteristic:  
E

Sequence

GACATCCAGATGACGCAGTCTCCATCCTCC  
CTGTCTGCCTCTCTGGGA 48  
GACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGT  
CAGGATATTAGCAATTAT 96  
TTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAA  
CTGTAAACTCCTGATC 144  
TACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCC  
CATCAAGGTTTCAGTGGC 192  
AGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTCACC  
ATCAGCAACCTGGAACCT 240  
GAAGATATTGCCACTTACTTTTGTCTCAGCAAT  
ATAGTGAATTTCCGTGG 288  
ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAAT  
CAAACGG 324

[0069]

Sequence number: 5

Length of a sequence: 118

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

Kind of sequence: Peptide

Sequence

ValGlnLeuGlnGlnSerGlyAlaGluLeuValArgProGly  
ThrSer  
1 5 10  
15  
ValLysMetSerCysLysAlaAlaGlyTyrThrPheThrAsn  
TyrTrp  
20 25  
30  
IleGlyTrpValLysGlnArgProGlyHisGlyLeuGluTrpIle  
Gly

Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly	35	40
	35	45
40	45	TyrLeuTyrProGlyGlyLeuTyrThrAsnTyrAsnGluLy
Tyr Leu Tyr Pro Gly Gly Leu Tyr	sPheLys	
Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	50	55
Lys	60	
50	55	GlyLysAlaThrLeuThrAlaAspThrSerSerSerThrAl
60	aTyrMet	
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp	65	70
Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met	75	80
65	70	GlnLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlalleTyrTy
75	80	rCysAla
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser	85	90
Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys	95	ArgTyrArgAspTyrAspTyrAlaMetAspTyrTrpGlyGl
Ala	100	nGlyThr
85	110	105
90	95	ThrValThrValSerSer
Arg Tyr Arg Asp Tyr Asp Tyr Ala	115	
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100		
105	110	
Thr Val Thr Val Ser Ser		
115		

## 【0070】

配列番号: 6  
 配列の長さ: 354  
 配列の型: 核酸  
 鎖の数: 二本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: cDNA to mRNA  
 起源  
 マウス  
 配列の特徴:  
 特徴を決定した方法: E  
 配列  
 GTG CAG CTG CAG CAG TCA  
 GGA GCT GAG CTG GTA  
 AGG CCT GGG ACT TCA  
 48  
 GTG AAG ATG TCC TGC AAG  
 GCT GCT GGA TAC ACC TTC  
 ACT AAC TAC TGG 96  
 ATA GGT TGG GTA AAG CAG

## [0070]

Sequence number: 6  
 Length of a sequence: 354  
 Sequence-type: Nucleic acid  
 The number of chains: It is double stranded.  
 Topology: Linear  
 Kind of sequence: cDNA to mRNA  
 Origin  
 Mouse  
 The characteristic of a sequence:  
 Method to have determined the characteristic:  
 E  
 Sequence  
 GTGCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCTGAGCT  
 GGTAAGGCCTGGGACTTCA 48  
 GTGAAGATGTCCTGCAAGGCTGCTGGATAC  
 ACCTTCACTAACTACTGG 96  
 ATAGGTTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACAT  
 GGCCTTGAGTGGATTGGA 144  
 TATCTTTACCCTGGAGGTCTTTATACTAACTA  
 CAATGAGAAGTTCAAG 192  
 GGCAAGGCCACACTGACTGCAGACACATC  
 CTCCAGCACAGCCTACATG 240



```

AGG CCT GGA CAT GGC CTT CAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCT
GAG TGG ATT GGA      144 GCCATCTATTACTGTGCA      288
TAT CTT TAC CCT GGA GGT AGATACAGGGATTACGACTATGCTATGGACT
CTT TAT ACT AAC TAC AAT ACTGGGGCCAAGGGACC      336
GAG AAG TTC AAG      192 ACGGTCACCGTCTCCTCA
GGC AAG GCC ACA CTG ACT 354
GCA GAC ACA TCC TCC AGC
ACA GCC TAC ATG      240
CAG CTC AGC AGC CTG ACA
TCT GAG GAC TCT GCC ATC
TAT TAC TGT GCA      288
AGA TAC AGG GAT TAC GAC
TAT GCT ATG GAC TAC TGG
GGC CAA GGG ACC      336
ACG GTC ACC GTC TCC TCA
354

```

## 【0071】

配列番号：7  
 配列の長さ：113  
 配列の型：アミノ酸  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：ペプチド

## 配列

```

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr
Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile
Gly
1
10
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys
Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn
Ser
20
25
30
Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Gly
Trp Cys Leu Gln Lys Pro Gly
Gln Ser
35
40
45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
Pro
50
55
60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

```

## [0071]

Sequence number: 7  
 Length of a sequence: 113  
 Sequence-type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Kind of sequence: Peptide

## Sequence

```

AspValLeuMetThrGlnThrProLeuSerLeuProValA
snlleGly
1
5
10
AspGlnAlaSerIleSerCysLysSerThrLysSerLeuLe
uAsnSer
20
25
30
AspGlyPheThrTyrLeuGlyTrpCysLeuGlnLysPro
GlyGlnSer
35
40
45
ProGlnLeuLeuIleTyrLeuValSerAsnArgPheSerGl
yValPro
50
55
60
AspArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThr
LeuLysIle
65
70
75
80
SerArgValGluAlaGluAspLeuGlyValTyrTyrCysPh
eGlnSer
85
90
95

```

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu  
 Lys Ile Glu Ile Lys 105  
 65 70 100  
 75 80 110  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Arg  
 Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe  
 Gln Ser  
 85  
 90 95  
 Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe  
 Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 Lys  
 100  
 105 110  
 Arg

## 【0072】

配列番号：8  
 配列の長さ：339  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

GAT GTT TTG ATG ACC CAA  
 ACT CCA CTC TCT CTG CCT  
 GTC AAT ATT GGA 48  
 GAT CAA GCC TCT ATC TCT  
 TGC AAG TCT ACT AAG AGC  
 CTT CTG AAT AGT 96  
 GAT GGA TTC ACT TAT TTG  
 GGC TGG TGC CTG CAG  
 AAG CCA GGC CAG TCT  
 144  
 CCA CAG CTC CTA ATA TAT  
 TTG GTT TCT AAT CGA TTT  
 TCT GGA GTT CCA 192  
 GAC AGG TTC AGT GGT AGT  
 GGG TCA GGC ACA GAT TTC  
 ACC CTC AAG ATC 240

## [0072]

Sequence number: 8  
 Length of a sequence: 339  
 Sequence type: Nucleic acid  
 The number of chains: It is double stranded.  
 Topology: Linear  
 Kind of sequence: cDNA to mRNA

Origin

Mouse

The characteristic of a sequence :

Method to have determined the characteristic:

E

Sequence

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCTC  
 TGCCTGTCAATATTGGA 48  
 GATCAAGCCTCTATCTCTTGCAAGTCTACTA  
 AGAGCCTTCTGAATAGT 96  
 GATGGATTCACTTATTTGGGCTGGTGCCTG  
 CAGAAGCCAGGCCAGTCT 144  
 CCACAGCTCCTAATATATTTGGTTTCTAATCG  
 ATTTTCTGGAGTTCCA 192  
 GACAGGTTCAAGTGGTAGTGGGTCAGGGAC  
 AGATTTACCCTCAAGATC 240  
 AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGT  
 TTATTATTGCTTCCAGAGT 288  
 AACTATCTTCCTCTTACGTTTCGGATCGGGGA  
 CCAAGCTGGAAATAAAA 336  
 CGG 339

AGC AGA GTG GAG GCT  
 GAG GAT TTG GGA GTT TAT  
 TAT TGC TTC CAG AGT  
 288  
 AAC TAT CTT CCT CTT ACG  
 TTC GGA TCG GGG ACC  
 AAG CTG GAA ATA AAA  
 336  
 CGG  
 339

## 【0073】

配列番号：9  
 配列の長さ：116  
 配列の型：アミノ酸  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：ペプチド  
 配列

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro  
 Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser  
 1 5  
 10 15  
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser  
 Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser Trp  
 20 30  
 25 30  
 Met Asn Trp Val Lys Gln Arg  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 Gly  
 35 45  
 Arg Ile Tyr Pro Val Asn Gly Asp  
 Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe  
 Lys  
 50 55  
 60 65  
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala As  
 p Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 Met  
 65 70  
 75 80  
 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser  
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe  
 Cys Ala  
 85 95  
 90 95

## [0073]

Sequence number: 9  
 Length of a sequence: 116  
 Sequence type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Kind of sequence: Peptide  
 Sequence  
 ValLysLeuGlnGluSerGlyProGluLeuValLysProGlyAlaSer  
 1 5 10  
 15  
 ValLysIleSerCysLysAlaSerGlyTyrAlaPheSerSerSerTrp  
 20 25  
 30  
 MetAsnTrpValLysGlnArgProGlyLysGlyLeuGluTrpIleGly  
 35 40  
 45  
 ArgIleTyrProValAsnGlyAspThrAsnTyrAsnGlyLysPheLys  
 50 55  
 60  
 GlyLysAlaThrLeuThrAlaAspLysSerSerSerThrAlaTyrMet  
 65 70  
 75 80  
 GlnLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrPheCysAla  
 85 90 95  
 ThrAspGlyTyrTrpTyrPheAspValTrpGlyGlnGlyThrThrVal  
 100 105  
 110  
 ThrValSerSer  
 115

Thr Asp Gly Tyr Trp Tyr Phe  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 Val

100

105

110

Thr Val Ser Ser

115

## 【0074】

配列番号: 10

配列の長さ: 348

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴:

特徴を決定した方法: E

配列

GTG AAG CTG CAG GAG TCT  
 GGA CCT GAG CTG GTG  
 AAG CCT GGG GCC TCA  
 48  
 GTG AAG ATT TCC TGC AAG  
 GCT TCT GGC TAT GCA TTC  
 AGT AGC TCC TGG 96  
 ATG AAC TGG GTG AAA CAG  
 AGG CCT GGG AAG GGT  
 CTT GAG TGG ATT GGA  
 144  
 CGG ATT TAT CCT GTA AAT  
 GGA GAT ACT AAC TAC AAT  
 GGG AAG TTC AAG 192  
 GGC AAG GCC ACA CTG ACT  
 GCA GAC AAA TCC TCC AGC  
 ACA GCC TAC ATG 240  
 CAA CTC AGC AGC CTG ACA  
 TCT GAG GAC TCT GCG GTC  
 TAC TTC TGT GCA 288  
 ACC GAT GGT TAC TGG TAC  
 TTC GAT GTC TGG GGC CAA  
 GGG ACC ACG GTC 336  
 ACC GTC TCC TCA

## [0074]

Sequence number: 10

Length of a sequence: 348

Sequence-type: Nucleic acid

The number of chains: It is double stranded.

Topology: Linear

Kind of sequence: cDNA to mRNA

Origin

Mouse

The characteristic of a sequence:

Method to have determined the characteristic:

E

Sequence

GTGAAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCT  
 GGTGAAGCCTGGGGCCTCA 48  
 GTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTAT  
 GCATTGAGTAGCTCCTGG 96  
 ATGAACTGGGTGAAACAGAGGCCTGGGAA  
 GGGTCTTGAGTGGATTGGA 144  
 CGGATTTATCCTGTAAATGGAGATACTAACTA  
 CAATGGGAAGTTCAAG 192  
 GGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCC  
 TCCAGCACAGCCTACATG 240  
 CAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCT  
 GCGGTCTACTTCTGTGCA 288  
 ACCGATGGTTACTGGTACTTCGATGTCTGG  
 GGCCAAGGGACCACGGTC 336  
 ACCGTCTCCTCA 348

348

【0075】

配列番号：11

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly  
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
Ser

1 5  
10 15  
Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val  
Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
Tyr

20  
25 30  
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe  
Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
Met

35  
40 45  
Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser  
Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
Lys

50 55  
60  
Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp  
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
Leu

65 70  
75 80  
Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr  
Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
Ala

85  
90 95  
Val Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser Ser  
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
Thr

100  
105 110  
Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

[0075]

Sequence number: 11

Length of a sequence: 118

Sequence-type: Amino acid

Topology: Linear

Kind of sequence: Peptide

Sequence

ValGlnLeuGlnGluSerGlyProGlyLeuValLysProS  
erGlnSer

1 5 10  
15

LeuSerLeuThrCysSerValThrGlyTyrSerIleThrSer  
GlyTyr

20 25  
30

TyrTrpAsnTrpIleArgGlnPheProGlyAsnLysLeuGl  
uTrpMet

35 40  
45

GlyTyrIleSerTyrAspGlySerAsnAsnTyrAsnProSe  
rLeuLys

50 55  
60

AsnArgIleSerIleThrArgAspThrSerLysAsnGlnPh  
ePheLeu

65 70  
75 80

LysLeuAsnSerValThrThrGluAspThrAlaThrTyrTy  
rCysAla

85 90 95  
ValTyrTyrTyrAspGlySerSerPheAspTyrTrpGlyGl  
nGlyThr

100 105  
110

ThrValThrValSerSer  
115

## 【0076】

配列番号：12  
 配列の長さ：354  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：cDNA to mRNA  
 起源  
 マウス  
 配列の特徴：  
 特徴を決定した方法：E  
 配列  
 GTG CAG CTG CAG GAG TCT  
 GGA CCT GGC CTC GTG AAA  
 CCT TCT CAG TCT 48  
 CTG TCT CTC ACC TGC TCT  
 GTC ACT GGC TAC TCC ATC  
 ACC AGT GGT TAT 96  
 TAC TGG AAC TGG ATC CGG  
 CAG TTT CCA GGA AAC AAA  
 CTG GAA TGG ATG 144  
 GGC TAC ATA AGC TAC GAT  
 GGT AGC AAT AAC TAC AAC  
 CCA TCT CTC AAA 192  
 AAT CGA ATC TCC ATC ACT  
 CGT GAC ACA TCT AAG AAC  
 CAG TTT TTC CTG 240  
 AAG TTG AAT TCT GTG ACT  
 ACT GAG GAC ACA GCC ACA  
 TAT TAC TGT GCC 288  
 GTT TAT TAC TAC GAT GGT  
 AGC TCT TTT GAC TAC TGG  
 GGC CAA GGG ACC 336  
 ACG GTC ACC GTC TCC TCA  
 354

## 【0077】

配列番号：13  
 配列の長さ：112  
 配列の型：アミノ酸  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：ペプチド  
 配列

## [0076]

Sequence number: 12  
 Length of a sequence: 354  
 Sequence-type: Nucleic acid  
 The number of chains: It is double stranded.  
 Topology: Linear  
 Kind of sequence: cDNA to mRNA  
 Origin  
 Mouse  
 The characteristic of a sequence :  
 Method to have determined the characteristic:  
 E  
 Sequence  
 GTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGGCCT  
 CGTGAAACCTTCTCAGTCT 48  
 CTGTCTCTCACCTGCTCTGTCACTGGCTAC  
 TCCATCACCAGTGGTTAT 96  
 TACTGGAAGTGGATCCGGCAGTTTCCAGGA  
 AACAACTGGAATGGATG 144  
 GGCTACATAAGCTACGATGGTAGCAATAACT  
 ACAACCCATCTCTCAA 192  
 AATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCTA  
 AGAACCAAGTTTTTCCTG 240  
 AAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACA  
 GCCACATATTACTGTGCC 288  
 GTTTATTACTACGATGGTAGCTCTTTTGACTA  
 CTGGGGCCAAGGGACC 336  
 ACGGTCACCGTCTCCTCA  
 354

## [0077]

Sequence number: 13  
 Length of a sequence: 112  
 Sequence-type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Kind of sequence: Peptide  
 Sequence

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Arg 1 5 10 15 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Gly Val Asp Ser Tyr 20 25 30 Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro 35 40 45 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Tyr Leu Lys Ser Gly Val Pro Ala 50 55 60 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp 65 70 75 80 Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn 85 95 90 95 Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg 100 105 110	AspIleValLeuThrGlnSerProAlaSerLeuAlaValSer LeuArg 1 5 10 15 GlnArgAlaThrIleSerCysArgAlaSerGluGlyValAsp SerTyr 20 25 30 GlyIleSerPheMetHisTrpTyrGlnGlnLysProGlyGln ProPro 35 40 45 LysLeuLeuIleTyrArgAlaSerTyrLeuLysSerGlyVal ProAla 50 55 60 ArgPheSerGlySerGlySerArgThrAspPheThrLeu ThrIleAsp 65 70 75 80 ProValGluAlaAspAspAlaAlaThrTyrTyrCysGlnGln nAsnAsn 85 90 95 GluAspProTrpThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGluIle eLysArg 100 105 110
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**【0078】**

配列番号：14  
 配列の長さ：336  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：cDNA to mRNA  
 起源  
 マウス  
 配列の特徴：  
 特徴を決定した方法：E

**[0078]**

Sequence number: 14  
 Length of a sequence: 336  
 Sequence-type: Nucleic acid  
 The number of chains: It is double stranded.  
 Topology: Linear  
 Kind of sequence: cDNA to mRNA  
 Origin  
 Mouse  
 The characteristic of a sequence :  
 Method to have determined the characteristic:  
 E  
 Sequence  
 GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTT

## 配列

GAC ATT GTG CTG ACC CAA  
TCT CCA GCT TCT TTG GCT  
GTG TCT CTA AGG 48  
CAG AGG GCC ACC ATA TCC  
TGC AGA GCC AGT GAA GGT  
GTT GAT AGT TAT 96  
GGC ATT AGT TTT ATG CAC  
TGG TAC CAG CAG AAA CCA  
GGA CAG CCA CCC 144  
AAA CTC CTC ATC TAT CGT  
GCA TCC TAC CTA AAA TCT  
GGG GTC CCT GCC 192  
AGG TTC AGT GGT AGT GGG  
TCT AGG ACA GAC TTC ACC  
CTC ACC ATT GAT 240  
CCT GTG GAG GCT GAT GAT  
GCT GCA ACC TAT TAC TGT  
CAG CAA AAT AAT 288  
GAG GAT CCG TGG ACG TTC  
GGT GGA GGC ACC AAG  
CTG GAA ATC AAA CGG  
336

TGGCTGTGTCTCTAAGG 48  
CAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAGCCAGT  
GAAGGTGTTGATAGTTAT 96  
GGCATTAGTTTTATGCACTGGTACCAGCAGA  
AACCAGGACAGCCACCC 144  
AAACTCCTCATCTATCGTGCATCCTACCTAA  
AATCTGGGGTCCCTGCC 192  
AGGTTTCAGTGGTAGTGGGTCTAGGACAGAC  
TTCACCCTCACCATTGAT 240  
CCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTAT  
TACTGTGAGCAAAATAAT 288  
GAGGATCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCAC  
CAAGCTGGAAATCAAACGG 336

## 【0079】

配列番号: 15  
配列の長さ: 117  
配列の型: アミノ酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: ペプチド

## 配列

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala  
Glu Pro Ala Lys Pro Gly Ala Ser  
1 5  
10 15  
Val Lys Met Ser Cys Lys Ala  
Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
Trp  
20  
25 30  
Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro  
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
35  
40 45  
Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr  
Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe  
60

## [0079]

Sequence number: 15  
Length of a sequence: 117  
Sequence-type: Amino acid  
Topology: Linear  
Kind of sequence: Peptide

## Sequence

ValGlnLeuGlnGluSerGlyAlaGluProAlaLysProGlyAlaSer  
1 5 10  
15  
ValLysMetSerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrThrTyrTrp  
20 25  
30  
MetHisTrpValLysGlnArgProGlyGlnGlyLeuGluTrpIleGly  
35 40  
45  
TyrIleAsnProSerSerGlyTyrThrGluTyrAsnGlnLysPheLys  
50 55  
60



Lys		AspLysAlaThrLeuThrAlaAspLysSerSerSerThrAla
50	55	aTyrMet
60		65
Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala	75	80
Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	GlnLeulleSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyr	
Met	CysAla	
65	70	85
75	80	90
Gln Leu Ile Ser Leu Thr Ser Glu	ArgArgGlyAsnTyrTyrTyrPheAspTyrTrpGlyGlnGl	95
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	yThrThr	100
	110	105
	ValThrValSerSer	
90	95	115
Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Tyr Phe		
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
100		
105	110	
Val Thr Val Ser Ser		
115		

## 【0080】

配列番号 : 16

配列の長さ : 351

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to

mRNA

起源

マウス

配列の特徴 :

特徴を決定した方法 : E

配列

GTG CAG CTG CAG GAG TCT  
 GGG GCT GAA CCG GCA  
 AAA CCT GGG GCC TCA  
 48  
 GTG AAG ATG TCC TGC AAG  
 GCT TCT GGC TAC ACC TTT  
 ACT ACC TAC TGG 96  
 ATG CAC TGG GTA AAA CAG  
 AGG CCT GGA CAG GGT  
 CTG GAA TGG ATT GGA  
 144  
 TAC ATT AAT CCT AGC AGT  
 GGT TAT ACT GAG TAC AAT

## [0080]

Sequence number: 16

Length of a sequence: 351

Sequence-type: Nucleic acid

The number of chains: It is double stranded.

Topology: Linear

Kind of sequence: cDNA to mRNA

Origin

Mouse

The characteristic of a sequence :

Method to have determined the characteristic:

E

Sequence

GTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAACC  
 GGCAAACCTGGGGCCTCA 48  
 GTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTAC  
 ACCTTTACTACCTACTGG 96  
 ATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAG  
 GGTCTGGAATGGATTGGA 144  
 TACATTAATCCTAGCAGTGGTTATACTGAGTA  
 CAATCAGAAGTTCAAG 192  
 GACAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCC  
 TCCAGCACAGCCTACATG 240  
 CAACTAATCAGCCTGACATCTGAGGACTCT  
 GCAGTCTATTACTGTGCA 288  
 AGAAGGGGTAATTACTACTACTTTGACTACT  
 GGGGCCAAGGGACCACG 336  
 GTCACCGTCTCCTCA 351

CAG AAG TTC AAG 192  
 GAC AAG GCC ACA TTG ACT  
 GCA GAC AAA TCC TCC AGC  
 ACA GCC TAC ATG 240  
 CAA CTA ATC AGC CTG ACA  
 TCT GAG GAC TCT GCA GTC  
 TAT TAC TGT GCA 288  
 AGA AGG GGT AAT TAC TAC  
 TAC TTT GAC TAC TGG GGC  
 CAA GGG ACC ACG 336  
 GTC ACC GTC TCC TCA  
 351

## 【0081】

配列番号: 17  
 配列の長さ: 105  
 配列の型: アミノ酸  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: ペプチド

## 配列

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr  
 Pro Lys Phe Leu Pro Val Ser  
 Ala Gly  
 1 5  
 10 15  
 Asp Arg Val Thr Met Thr Cys  
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Asn  
 Asn  
 20 30  
 25 35  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 45  
 40 50  
 Tyr Tyr Thr Ser Asn Arg Tyr Thr  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr  
 Gly  
 50 55  
 60 70  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln  
 Val  
 65 75  
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe  
 Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser

## [0081]

Sequence number: 17  
 Length of a sequence: 105  
 Sequence-type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Kind of sequence: Peptide

## Sequence

AspValLeuMetThrGlnThrProLysPheLeuProValS  
 erAlaGly  
 1 5 10  
 15  
 AspArgValThrMetThrCysLysAlaSerGlnSerValGl  
 yAsnAsn  
 20 25  
 30  
 ValAlaTrpTyrGlnGlnLysProGlyGlnSerProLysLe  
 uLeulle  
 35 40  
 45  
 TyrTyrThrSerAsnArgTyrThrGlyValProAspArgPh  
 eThrGly  
 50 55  
 60  
 SerGlySerGlyThrAspPheThrPheThrIleSerSerV  
 alGlnVal  
 65 70  
 75 80  
 GluAspLeuAlaValTyrPheCysGlnGlnHisTyrSerS  
 erProTyr  
 85 90 95  
 ThrPheGlySerGlyThrLysLeuGlu  
 100 105

Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys  
Leu Glu

100

105

## 【0082】

配列番号: 18

配列の長さ: 315

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to

mRNA

起源

マウス

配列の特徴:

特徴を決定した方法: E

配列

GAT GTT TTG ATG ACC CAA  
 ACT CCA AAA TTC CTG CCT  
 GTA TCA GCA GGA 48  
 GAC AGG GTT ACC ATG ACC  
 TGC AAG GCC AGT CAG AGT  
 GTG GGT AAT AAT 96  
 GTG GCC TGG TAC CAA CAG  
 AAG CCA GGA CAG TCT CCT  
 AAA CTG CTG ATA 144  
 TAC TAT ACA TCC AAT CGC  
 TAC ACT GGA GTC CCT GAT  
 CGC TTC ACT GGC 192  
 AGT GGA TCT GGG ACA GAT  
 TTC ACT TTC ACC ATC AGC  
 AGT GTG CAG GTT 240  
 GAA GAC CTG GCA GTT TAT  
 TTC TGT CAG CAG CAT TAT  
 AGC TCT CCG TAT 288  
 ACG TTC GGA TCG GGG  
 ACC AAG CTG GAG  
 315

## [0082]

Sequence number: 18

Length of a sequence: 315

Sequence type: Nucleic acid

The number of chains: It is double stranded.

Topology: Linear

Kind of sequence: cDNA to mRNA

Origin

Mouse

The characteristic of a sequence:

Method to have determined the characteristic:

E

Sequence

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCAAAATTCC  
 TGCCTGTATCAGCAGGA 48  
 GACAGGGTTACCATGACCTGCAAGGCCAGT  
 CAGAGTGTGGGTAATAAT 96  
 GTGGCCTGGTACCAACAGAAGCCAGGACA  
 GTCTCCTAAACTGCTGATA 144  
 TACTATACATCCAATCGCTACACTGGAGTCC  
 CTGATCGCTTCACTGGC 192  
 AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTTTCACC  
 ATCAGCAGTGTGCAGGTT 240  
 GAAGACCTGGCAGTTTATTTCTGTCAGCAG  
 CATTATAGCTCTCCGTAT 288  
 ACGTTCGGATCGGGGACCAAGCTGGAG  
 315

【図面の簡単な説明】

[BRIEF EXPLANATION OF DRAWINGS]

**【図 1】**

図 1 は、抗 Fas L 抗体の VH の遺伝子及び VL の遺伝子の PCR 反応液のミニゲル電気泳動図である。

**[FIGURE 1]**

Figure 1 is mini gel electropherogram of PCR reaction solution of the gene of VH of an anti-FasL antibody, and the gene of VL.

**【図 2】**

図 2 は、NOK 4 の VH の遺伝子の PCR 生成物のミニゲル電気泳動図である。

**[FIGURE 2]**

Figure 2 is mini gel electropherogram of PCR product of the gene of VH of NOK 4.

**【図 3】**

図 3 は、プラスミド DNA のミニゲル電気泳動図である。

**[FIGURE 3]**

Figure 3 is mini gel electropherogram of plasmid DNA.

**【図 4】**

図 4 は、モノクローナル抗体 NOK 1～5 の VH 領域 (H 鎖) のアミノ酸配列であり、四角の線で囲った箇所は、超可変領域 (CDR 1～3) である。

**[FIGURE 4]**

Figure 4 is the amino acid sequence of VH region (heavy chain) of monoclonal-antibody NOK 1-5.

The part enclosed with the square line is a hypervariable region (CDR 1-3).

**【図 5】**

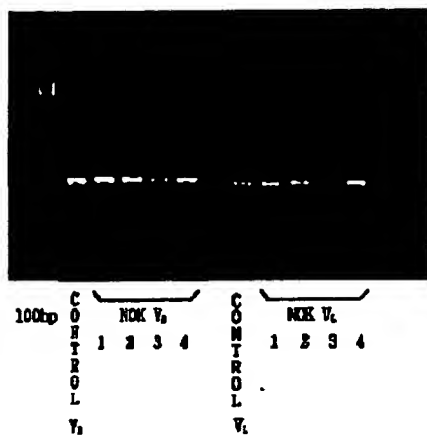
図 5 は、モノクローナル抗体 NOK 1、2、4、5 の VL 領域 (L 鎖) のアミノ酸配列であり、四角の線で囲った箇所は、超可変領域 (CDR 1～3) である。

**[FIGURE 5]**

Figure 5 is the amino acid sequence of VL region (L chain) of monoclonal-antibody NOK 1, 2, 4, and 5.

The part enclosed with the square line is a hypervariable region (CDR 1-3).

**【図 1】****[FIGURE 1]**



【図 2】

[FIGURE 2]



【図 3】

[FIGURE 3]



1  
X  
b  
p

NOK4 NOK5 NOK5 NOK5 NOK5

V<sub>L</sub> V<sub>L</sub> V<sub>L</sub> V<sub>L</sub> V<sub>L</sub>

[ 4 ]

[FIGURE 4]

		CDR1	CDR2	
NOK1VH . amino	1: VQLQESGPPELVKPGASVKISCKASGYAF	SSSWMFWVKQRP	GKLEWIGRIYPGDGDTN	58
NOK2VH . amino	1: VQLQQSGAELVRPGTSVKMSCKAAGYTF	TNYWIGFWVKQRP	GHGLEWIGLYPGGLYTN	58
NOK3VH . amino	1: VKLQESGPPELVKPGASVKISCKASGYAF	SSSWMFWVKQRP	GKLEWIGRIYPVNGDTN	58
NOK4VH . amino	1: VQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSQYYW	NWIRQFPGNKLEWIG	YISYDGSNN	58
NOK5VH . amino	1: VQLQESGAEPAPKPGASVKMSCKASGYTF	TTYWMFWVKQRP	GQGLEWIGYINPSSGYTE	58
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	

		CDR3	
NOK1VH . amino	59: DNGKFKKATLTADKSSSTAYNQLSSLTSEDSAVYFCARSYYYDGSPW	FTYWGQGTIVT	117
NOK2VH . amino	59: YNEKFKKATLTADTSSSTAYNQLSSLTSEDSAIYYCARYRDYD	YAMDY	115
NOK3VH . amino	59: YNGKFKKATLTADKSSSTAYNQLSSLTSEDSAVYFCA	T---DGY	113
NOK4VH . amino	59: YNP SLKNRISITRDTSEKQFFLKLNSVTITDTATYYCA	VYYYDG	115
NOK5VH . amino	59: YNQKFKKATLTADKSSSTAYNQLISLTSEDSAVYFCARRGNY	YYFDY	114
	* * * * *	* * * * *	*****

NOK1VH . amino	118: VSS	120
NOK2VH . amino	116: VSS	118
NOK3VH . amino	114: VSS	116
NOK4VH . amino	116: VSS	118
NOK5VH . amino	115: VSS	117
	***	

【図 5】

[FIGURE 5]

		CDR1	CDR2	
NOK1VL .amino	1:DIQMTQSPSSLSASLGDRVTISCRASQDISNY	LNWYQQKPDGTVKLLIY	YTSRLH	55
NOK2VL .amino	1:DVLMTQTPLSLPVNIGDQASISCKSTESLANS	SGFTYLGWCLQKPGQSPQLLI	LVSNRF	60
NOK4VL .amino	1:DIVLTQSPASLAVSLRQRATISCRASEGVDSY	GISFMHWYQQKPGQPPKLLIY	RASYLE	59
NOK5VL .amino	1:DVLMTQTTPKFLPVSA	GDRTMTCKASQSV	GNVHWYQQKPGQSPKLLIY	TSNRY 55
	* ** *	*	* *** **** *	

		CDR3	
NOK1VL .amino	56:SGVPSRFGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYFC	QQYSEFPWTFGGGTKLEIKR	108
NOK2VL .amino	61:SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC	SNY-LPLTFGSGTKLEIKR	113
NOK4VL .amino	60:SGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYFC	QNNEDPWTFGGGTKLEIKR	112
NOK5VL .amino	56:TEVPDRFTGSGSGTDFTTISSVQVEDLAVYFC	QQHYSSPYTFGSGTKLE	105
	*** ** **** ** *	* * * *	* *** *****



## DERWENT TERMS AND CONDITIONS

*Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)  
["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)